



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 122423

(13) C2

(51) МПК

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2018 06063</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Бейнстерс Петрус Якобус Йоганнес Антоніус (BE), Гейсен Генрикус Якобус Марія (BE), Дрінкенбург Вільгелмус Гелена Ігнатіус Марія (BE), Агнау Абдаллаг (BE)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>02.11.2016</b>	<b>(73)</b> Володілець (володільці):	<b>ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ, Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, Belgium (BE)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	<b>11.11.2020</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>15192661.5, 15192966.8</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2015/164508 A1, 29.10.2015</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>02.11.2015, 04.11.2015</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>EP, EP</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>27.08.2018, Бюл.№ 16</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про державну реєстрацію:	<b>10.11.2020, Бюл.№ 21</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/EP2016/076420, 02.11.2016</b>		

**(54) [1,2,4]ТРИАЗОЛО[1,5-а]ПІРИМІДИН-7-ІЛЬНА СПОЛУКА****(57) Реферат:**

Даний винахід стосується нової [1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідинільної похідної як інгібітора фосфодіестерази 2 (PDE2). Даний винахід також стосується фармацевтичних композицій, які містять сполуку, способів одержання такої сполуки і композицій, і застосування такої сполуки і композицій для попередження та лікування розладів, в які залучена PDE2, таких як неврологічні та психічні розлади.

UA 122423 C2



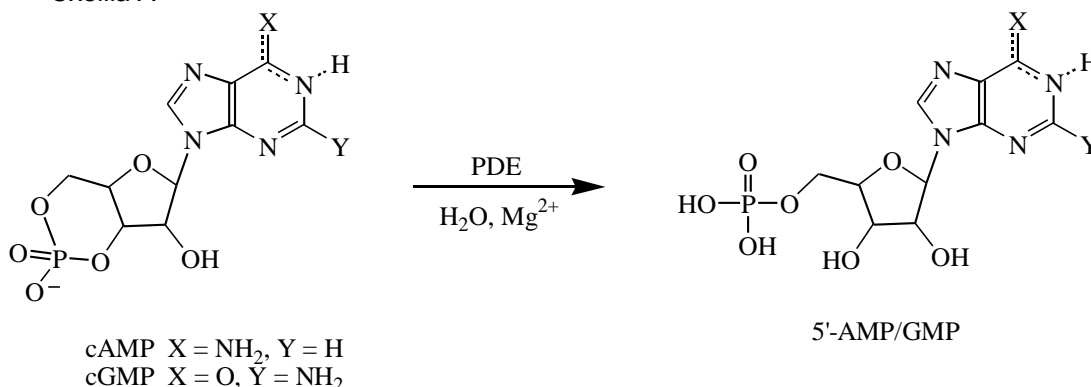
Галузь винаходу

Даний винахід стосується нової [1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідинільної похідної як інгібітора фосфодіестерази 2 (PDE2). Даний винахід також стосується фармацевтичних композицій, які містять сполуку, способів одержання таких сполуки і композицій і застосування таких сполуки і композицій для попередження та лікування розладів, в які залучена PDE2, таких як неврологічні та психічні розлади.

Передумови створення винаходу

Фосфодіестерази (PDE) являють собою родину ферментів, які кодується 21 геном і поділені на 11 окремих родин згідно зі структурними та функціональними властивостями. Ці ферменти здійснюють метаболічну інактивацію широко розповсюджених внутрішньоклітинних вторинних месенджерів, циклічного 3',5'-аденозинмонофосфату (сAMP) і циклічного 3',5'-гуанозинмонофосфату (сGMP). Ці два месенджери регулюють різноманіття біологічних процесів, у тому числі вироблення та дію прозапальних медіаторів, функціонування іонних каналів, скорочення м'язів, комітування, диференціювання, апоптоз, ліпогенез, глікогеноліз і глюконеогенез. Вони здійснюють це за допомогою активації протеїнкінази A (PKA) і протеїнкінази G (PKG), які, у свою чергу, фосфорилують велику кількість субстратів, у тому числі фактори транскрипції та іонні канали, які регулюють численні фізіологічні реакції. У випадку нейронів передбачається активація сAMP- та сGMP-залежних кіназ із наступним фосфорилуванням білків, залучених у швидку регуляцію синаптичної передачі, а також у диференціювання та виживання нейронів. Внутрішньоклітинні концентрації сAMP і сGMP точно регулюються швидкістю біосинтезу за допомогою циклаз і швидкістю розщеплення за допомогою PDE. PDE являють собою гідролази, які інактивують сAMP і сGMP шляхом каталітичного гідролізу 3'-естерного зв'язку з утворенням неактивного 5'-монофосфату (схема А).

Схема А



Відповідно до субстратної специфічності родин PDE можна виділити три групи: i) сAMP-специфічні PDE, які включають PDE4, 7 і 8; ii) сGMP-селективні ферменти PDE5, 6 і 9 та iii) PDE, які діють на два субстрати, PDE1, 2 і 3, а також PDE10 та 11.

Окрім того, для PDE характерна диференційна експресія у всьому організмі, в тому числі в центральній нервовій системі. Таким чином, різні ізоферменти PDE можуть мати різні фізіологічні функції. Сполуки, які селективно інгібують родини або ізоферменти PDE, можуть виявляти особливу терапевтичну активність, меншу кількість побічних ефектів або і те, і інше.

Фосфодіестераза 2A (PDE2A) інактивує внутрішньоклітинні механізми передачі сигналів, які залежать від передачі сигналів за допомогою циклічних нуклеотидів, опосередкованої сAMP і сGMP, завдяки їхньому розщепленню (шляхом гідролізу важливих із біологічного погляду вторинних месенджерів сAMP і сGMP із одержанням відповідно AMP і GMP, які не передають сигнали). Такі сигнальні шляхи, як відомо, відіграють роль у регуляції генів, залучених в індукцію синаптичної пластичності.

Фармакологічне інгібування PDE2, таким чином, зумовлює підвищення рівнів синаптичної пластичності (корелята, який лежить в основі навчання та формування пам'яті), що вказує на те, що модуляція PDE2A може являти собою мішень для полегшення порушень пізнавальних здібностей, які спостерігаються у людей, що страждають такими розладами, як, наприклад, шизофренія, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона та інші розлади ЦНС, асоційовані з когнітивною дисфункцією.

Фосфодіестераза 2A (PDE2A) експресується у головному мозку в великій кількості порівняно з периферичними тканинами. Високий рівень експресії PDE2 в лімбічній системі (ізокортексі, гіпокампі, мигдалеподібному тілі, повідці епіталамуса, базальному ядрі) вказує на те, що PDE2 може модулювати передачу сигналу між нейронами, пов'язану з емоціями, сприйняттям,

увагою, навчанням і пам'яттю. Окрім того, PDE2 експресується в прилеглому ядрі, нюховій цибулині, нюховому горбку та мигдалеподібному тілі, що підтверджує припущення, що PDE2 також може бути залучена до тривожності та депресії (див., наприклад, Lakics, V. et al. (2010) Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacol.* 59, 367-374).

Окрім того, було показано, що інгібітори PDE2 корисні для послаблення індукованої окиснювальним стресом тривожності, що підтверджує їх застосування в лікуванні тривожності при нейропсихічних та нейродегенеративних розладах, до яких залучений окиснювальний стрес, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона та розсіяний склероз.

Було показано, що інгібітори PDE2 підсилюють довготривалу потенціацію синаптичної передачі та поліпшують запам'ятовування і консолідацію пам'яті під час розпізнавання об'єкта та в тестах соціальної орієнтації у пацюків. Окрім того, було показано, що інгібітори PDE2 усувають послаблення короткочасної пам'яті, індуковане МК-801, в Т-подібному лабіринті у мишей. Також було показано, що інгібітори PDE2 виявляють активність у тесті примусового плавання та моделях із світлою/темною камерою; а також демонструють ефекти, аналогічні анксиолітикам, в тестах із трохи піднятим хрестоподібним лабіринтом, платформою з отворами та тесті відкритого поля і запобігають викликаним стресом змінам апоптозу та поведінки.

Таким чином, інгібітори PDE2 можуть застосовуватися у лікуванні послаблення пам'яті, порушень пізнавальних здібностей, тривожності, біполярного розладу та депресії.

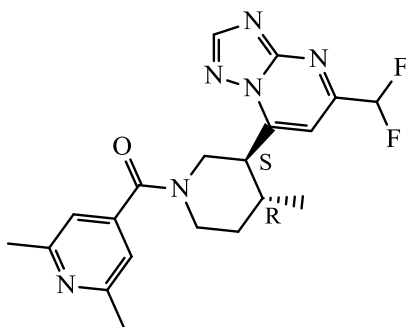
У WO2015/164508 (Dart Neuroscience, LLC) розкриті заміщенні [1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідинільні сполуки як інгібітори PDE2.

Усе ще існує необхідність у сполуках, які є інгібітором PDE2, з переважним поєднанням властивостей, таких як, наприклад, селективність щодо PDE2, добра хімічна стабільність та захоплення мішені завдяки займанню PDE2 та підвищення рівнів циклічних нуклеотидів у ділянках головного мозку, які мають важливе значення.

Короткий опис винаходу

Метою даного винаходу є забезпечення нового інгібітора PDE2, який може бути потенційно застосованим у лікуванні захворювань, пов'язаних із активністю ферменту PDE2.

Таким чином, даний винахід стосується сполуки 1



(1)

або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату.

У конкретному варіанті здійснення фармацевтично прийнятна сіль являє собою хлористоводневу сіль, більш конкретно сіль  $\cdot 2\text{HCl}$ .

Ілюстрацією даного винаходу є фармацевтична композиція, що містить фармацевтично прийнятний носій і вищевказану сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль або сольват. Ілюстрацією даного винаходу є фармацевтична композиція, одержана за допомогою змішування вищевказаної сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату та фармацевтично прийнятного носія. Ілюстрацією даного винаходу є спосіб одержання фармацевтичної композиції, який передбачає змішування вищевказаної сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату та фармацевтично прийнятного носія.

Додатковою ілюстрацією даного винаходу є способи підвищення нейронної пластичності, які передбачають введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або фармацевтичних композицій, описаних вище.

Прикладом даного винаходу є способи лікування розладу, опосередкованого ферментом PDE2, які передбачають введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або фармацевтичних композицій, описаних вище.

Додатковим прикладом даного винаходу є способи інгібування ферменту PDE2, які передбачають введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості

сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або фармацевтичних композицій, описаних вище.

Прикладом даного винаходу є спосіб лікування розладу, вибраного із групи, яка складається з неврологічних та психічних розладів, який передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або фармацевтичних композицій, описаних вище.

Прикладом даного винаходу є спосіб лікування розладу, вибраного із групи неврологічних та психічних розладів, вибраних із психотичних розладів і станів; тривожних розладів; рухових розладів; наркотичної залежності; афективних розладів; нейродегенеративних розладів; розладів або станів, які включають як симптом синдром дефіциту уваги та/або порушення пізнавальної діяльності; інсульту та аутичних розладів, який передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або фармацевтичних композицій, описаних вище.

Прикладом даного винаходу є спосіб лікування розладу, вибраного із групи, яка складається з неврологічних та психічних розладів, який передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або фармацевтичних композицій, описаних вище.

Прикладом даного винаходу є спосіб лікування розладу, вибраного із групи неврологічних та психічних розладів, вибраних із психотичних розладів і станів; тривожних розладів; рухових розладів; наркотичної залежності; афективних розладів; нейродегенеративних розладів; розладів або станів, які включають як симптом синдром дефіциту уваги та/або порушення пізнавальної діяльності; інсульту та аутичних розладів, який передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки 1, або її солі або сольвату, або фармацевтичних композицій, описаних вище.

Також прикладом даного винаходу є сполука 1, або її сіль або сольват, або фармацевтична композиція, описані вище, для застосування як лікарського препарату.

Додатковим прикладом даного винаходу є сполука 1, або її сіль або сольват, або фармацевтична композиція згідно з даним винаходом для застосування у лікуванні, попередженні, зменшенні інтенсивності вияву, контролі або зниженні ризику виникнення різних неврологічних та психічних розладів, асоційованих із порушенням функції фосфодіестерази 2, у ссавця, у тому числі у людини, лікування або попередження яких залежить від інгібування фосфодіестерази 2 або полегшується ним.

Прикладом даного винаходу є сполука 1 або її фармацевтично прийнятна сіль або сольват згідно з даним винаходом або фармацевтична композиція згідно з даним винаходом для застосування в лікуванні, попередженні, зменшенні інтенсивності вияву, контролі або зниженні ризику виникнення різних розладів, вибраних із психотичних розладів і станів; тривожних розладів; рухових розладів; наркотичної залежності; афективних розладів; нейродегенеративних розладів; розладів або станів, які включають як симптом синдром дефіциту уваги та/або порушення пізнавальної діяльності; інсульту й аутичного розладу.

Прикладом даного винаходу є спосіб лікування розладу, вибраного із групи, що складається із хвороби Альцгеймера, помірного когнітивного порушення, старечого недоумства, деменції, деменції з тільцями Леві, синдрому Дауна, деменції, асоційованої з інсультом, деменції, асоційованої із хворобою Паркінсона, і деменції, асоційованої з відкладанням бета-амілоїду, переважно хвороби Альцгеймера, який передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або фармацевтичних композицій, описаних вище.

Іншим прикладом даного винаходу є сполука 1 або її фармацевтично прийнятна сіль або сольват, описані вище, для застосування в лікуванні: (a) хвороби Альцгеймера, (b) помірного когнітивного порушення, (c) старечої деменції,

(d) деменції, (e) деменції з тільцями Леві, (f) синдрому Дауна, (g) деменції, асоційованої з інсультом, (h) деменції, асоційованої із хворобою Паркінсона, (i) деменції, асоційованої з відкладанням бета-амілоїду, (j) депресивних розладів і (k) тривожних розладів у суб'єкта, який потребує цього.

Опис графічних матеріалів

На фігурі 1 показаний ефект сполуки 1 щодо рівнів pGlu1 у гіпокампі пацюків Спраг-Дулі (10 мг/кг і 40 мг/кг сполуки 1). Показані вестерн-блоти від окремих пацюків (n=5 на обробку) (фіг. 1a). На фіг. 1b показана кількісна оцінка (рівнів pGlu1, нормалізованих щодо рівнів загального Glu1).

На фігурі 2 показана зайнятість PDE2 сполукою 1.

На фігурі 3 показаний ефект сполуки 1 щодо базальної синаптичної передачі в синапсі

моховитих волокон.

На фігурі 4 показаний дозозалежний ефект сполуки 1 щодо базальної синаптичної передачі в синапсі моховитих волокон.

На фігурах 5a і 5b показаний ефект сполуки 1 щодо індукції за допомогою слабкої HFS довготривалої потенціації (LTP) в синапсі моховитих волокон.

На фігурі 6 показаний ефект [CAS 1394033-54-5] 1 щодо базальної синаптичної передачі в синапсі моховитих волокон.

На фігурі 7 показане вимірювання рівнів cGMP в CSF у собак породи Marshall Beagle.

На фігурі 8a показана крива вводу/виводу для нахилу польового збуджувального постсинаптичного потенціалу (fEPSP), який реєстрували у зубчатій звивині; зареєстровані дані зразка показують середні відповіді у вигляді нахилу, що відповідає амплітуді популяційного спайку (PSA), із 30-хвилинними інтервалами; на фігурі 8b показано, що LTP, індукована високочастотною стимуляцією (HFS), підвищувалась за допомогою сполуки 1 в синапсах перфорантного шляху в порівнянні з умовою застосування середовища-носія; середній нормалізований нахил PSA до та після HFS нанесений на графік залежно від часу; вставлені східчасті діаграми показують середні дані за 30-хвилинні інтервали до та після процедури тетанізації; на фігурі 8c показані стійкі збільшення нахилу fEPSP. \*  $p < 0,05$  сполука 1 порівняно з середовищем-носієм у кожні 30-хвилинні інтервали часу.

Докладний опис винаходу

Визначення

Термін "суб'єкт", використовуваний у даному документі, стосується тварини, переважно ссавця, більш переважно людини, які є або були об'єктом лікування, спостереження або експерименту.

Термін "терапевтично ефективна кількість", використовуваний у даному документі, означає таку кількість активної сполуки або фармацевтичного засобу, що викликає біологічний або медичний ефект у системі тканин, у тварини або людини, який бажає отримати дослідник, ветеринар, лікар або інший клініцист, що включає полегшення симптомів захворювання або розладу, лікування якого здійснюють.

Термін "композиція", який застосовується в даному документі, призначений для охоплення продукту, що містить визначені інгредієнти у визначених кількостях, а також будь-якого продукту, який одержують прямо або опосередковано в результаті комбінування визначених інгредієнтів у визначених кількостях.

Термін "хазяїн" позначає ссавця, зокрема людей, мишей, собак і пацюків.

Термін "клітина" позначає клітину, що експресує або містить фермент PDE2.

Мається на увазі, що використовуваний у даному документі термін "сполука за даним винаходом" включає сполуку 1, а також її солі та сольвати.

Будь-яка хімічна формула, використовувана в даному документі, зі зв'язками, показаними лише у вигляді суцільних ліній, а не у вигляді суцільних клиноподібних або пунктирних клиноподібних зв'язків, або іншим чином показана як така, що має конкретну конфігурацію (наприклад, R, S) навколо одного або декількох атомів, передбачає кожний можливий стереоізомер або суміш двох або більше стереоізомерів.

Абсолютну конфігурацію визначають згідно із системою Кана-Інгольда-Прелога. Конфігурація при асиметричному атомі вказується як R або як S.

Якщо вказаний конкретний стереоізомер, це означає, що цей стереоізомер практично не містить інших стереоізомерів, тобто зв'язаний з менше ніж 50 %, переважно з менше ніж 20 %, більш переважно з менше ніж 10 %, ще більш переважно з менше ніж 5 %, зокрема з менше ніж 2 % і найбільш переважно з менше ніж 1 % інших стереоізомерів.

Окрім того, сполука за даним винаходом може утворювати сольвати з водою (тобто гідрати) або звичайними органічними розчинниками, при цьому також передбачається, що такі сольвати охоплюються обсягом даного винаходу.

Щодо застосування в медицині, солі сполуки 1 стосуються нетоксичних "фармацевтично прийнятних солей". Однак під час одержання сполуки 1 або її фармацевтично прийнятних солей можуть бути застосовані інші солі. Придатні фармацевтично прийнятні солі сполуки 1 включають солі приєднання кислоти, які можуть бути утворені, наприклад, за допомогою змішування розчину сполуки з розчином фармацевтично прийнятої кислоти, такої як хлористоводнева кислота, сірчана кислота, фумарова кислота, малеїнова кислота, бурштинова кислота, оцтова кислота, бензойна кислота, лимонна кислота, винна кислота, вугільна кислота або фосфорна кислота. Ілюстративні кислоти, які можна застосовувати під час одержання фармацевтично прийнятних солей, включають без обмеження наступні: оцтову кислоту, 2,2-дихлороцтову кислоту, ацильовані амінокислоти, адипінову кислоту, альгінову кислоту,

аскорбінову кислоту, L-аспарагінову кислоту, бензолсульфонову кислоту, бензойну кислоту, 4-ацетамідобензойну кислоту,

(+)-камфорну кислоту, камфорсульфонову кислоту, капринову кислоту, капронову кислоту, каприлову кислоту, коричну кислоту, лимонну кислоту, цикламову кислоту, етан-1,2-дисульфову кислоту, етансульфову кислоту, 2-гідроксietансульфову кислоту, мурашину кислоту, фумарову кислоту, галактарову кислоту, гентизинову кислоту, глюкогептонову кислоту, D-глюконову кислоту, D-глюкуронову кислоту, L-глутамінову кислоту, бета-оксоглутарову кислоту, гліколеву кислоту, гіпурову кислоту, бромистоводневу кислоту, соляну кислоту, (+)-L-молочну кислоту, (±)-DL-молочну кислоту, лактобіонову кислоту, малеїнову кислоту, (-)-L-яблучну кислоту, малонову кислоту, (±)-DL-мигдальну кислоту, метансульфову кислоту, нафталін-2-сульфову кислоту, нафталін-1,5-дисульфову кислоту, 1-гідрокси-2-нафтойну кислоту, нікотинову кислоту, азотну кислоту, олеїнову кислоту, оротову кислоту, щавлеву кислоту, пальмітинову кислоту, памову кислоту, фосфорну кислоту, L-піроглутамінову кислоту, саліцилову кислоту, 4-аміносаліцилову кислоту, себацінову кислоту, стеаринову кислоту, бурштинову кислоту, сірчану кислоту, дубильну кислоту, (+)-L-винну кислоту, тіоціанову кислоту, p-толуол-сульфову кислоту, трифторметилсульфову кислоту та ундециленову кислоту.

#### Фармакологія

Сполука згідно з даним винаходом інгібує активність ферменту PDE2, зокрема PDE2A, та, як наслідок, підвищує рівні cAMP або cGMP у клітинах, що експресують PDE2. Відповідно, інгібування активності ферменту PDE2 може бути застосовним у лікуванні захворювань, зумовлених недостатніми кількостями cAMP або cGMP у клітинах. Інгібітори PDE2 також можуть бути корисні в тих випадках, коли підвищення кількості cAMP або cGMP вище нормальних рівнів приводить в результаті до терапевтичного ефекту. Інгібітори PDE2 можна застосовувати для лікування неврологічних та психічних розладів.

Таким чином, даний винахід стосується сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом для застосування як лікарського препарату, а також застосування сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом або фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом для виготовлення лікарського препарату. Даний винахід також стосується сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом або фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом для застосування у лікуванні або попередженні, зокрема у лікуванні, стану у ссавця, у тому числі у людини, лікування або попередження якого залежить від інгібування ферменту фосфодіестерази 2 або полегшується ним. Даний винахід також стосується застосування сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом або фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом для виготовлення лікарського препарату для лікування або попередження, зокрема лікування, стану у ссавця, у тому числі у людини, лікування або попередження якого залежить від інгібування ферменту фосфодіестерази 2 або полегшується ним.

Даний винахід також стосується сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом або фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом для застосування у лікуванні, попередженні, зменшенні інтенсивності вияву, контролі або зниженні ризику виникнення різних неврологічних та психічних розладів, асоційованих із порушенням функції фосфодіестерази 2, у ссавця, у тому числі у людини, лікування або попередження яких залежить від інгібування фосфодіестерази 2 або полегшується ним.

Окрім того, даний винахід стосується застосування сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом або фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом для виготовлення лікарського препарату для лікування, попередження, зменшення інтенсивності вияву, контролю або зниження ризику розвитку різних неврологічних та психічних розладів, асоційованих із порушенням функції фосфодіестерази 2, у ссавця, у тому числі у людини, лікування або попередження яких залежить від інгібування фосфодіестерази 2 або полегшується ним.

Якщо зазначається, що даний винахід стосується застосування сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або композиції згідно з даним винаходом для виготовлення лікарського препарату, наприклад, для лікування суб'єкта, наприклад, ссавця, то мається на увазі, що таке застосування необхідно розуміти в певних сферах як спосіб, наприклад, лікування суб'єкта, який передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, наприклад, лікування, ефективної кількості сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або композиції згідно з даним винаходом.

Зокрема, показання, які можна лікувати за допомогою інгібіторів PDE2 окремо або в комбінації з іншими лікарськими засобами, включають без обмеження такі захворювання, які, як

вважають, частково опосередковані базальними гангліями, префронтальною корою та гіпокампом.

Ці показання включають неврологічні та психічні розлади, вибрані з психотичних розладів і станів; тривожних розладів; рухових розладів; наркотичної залежності; афективних розладів; 5 нейродегенеративних розладів; розладів або станів, які включають як симптом синдром дефіциту уваги та/або порушення пізнавальної діяльності; інсульту й аутичного розладу або аутизму.

Зокрема, психотичні розлади та стани, асоційовані з порушенням функції PDE2, включають 10 один або декілька із наступних станів або захворювань: шизофренія, наприклад, параноїдального, дезорганізованого, кататонічного, недиференційованого або резидуального типу; шизофреноформний розлад; шизоафективний розлад, як, наприклад, маніакального або депресивного типу; маніакальний розлад; психотичний розлад, викликаний вживанням певних речовин, такий як психоз, викликаний вживанням алкоголю, амфетаміну, марихуани, кокаїну, галюциногенних речовин, летких речовин наркотичної дії, опіоїдів або фенциклідину; розлади 15 особистості параноїдального типу і розлад особистості шизоїдного типу.

Зокрема, тривожні розлади включають панічний розлад; агорафобію; специфічну фобію, соціофобію; obsесивно-компульсивний розлад; посттравматичний стресовий розлад, гострий стресовий розлад та генералізований тривожний розлад.

Зокрема, рухові розлади включають хворобу Хантінгтона та дискінезію; хворобу Паркінсона; 20 синдром неспокійних ніг і есенційний тремор. Окрім того, можуть бути включені синдром Туретта й інші тикові розлади.

Зокрема, розлад центральної нервової системи являє собою розлад, пов'язаний із вживанням певних речовин, вибраний із групи зловживання алкоголем; алкогольної залежності; 25 алкогольного абстинентного синдрому; алкогольного абстинентного синдрому з делірієм; психотичного розладу, викликаного вживанням алкоголю; амфетамінової залежності; амфетамінового абстинентного синдрому; кокаїнової залежності; кокаїнового абстинентного синдрому; нікотинової залежності; нікотинового абстинентного синдрому; опіоїдної залежності та опіоїдного абстинентного синдрому.

Зокрема, афективні розлади та афективні епізоди включають депресію, манію та біполярні 30 розлади. Переважно афективний розлад вибраний із групи біполярних розладів (I і II типу); циклотимічного розладу; депресії; дистимічного розладу; значного депресивного розладу; терапевтично резистентної депресії та афективного розладу, викликаного вживанням певних речовин.

Зокрема, нейродегенеративні розлади включають хворобу Паркінсона; хворобу Хантінгтона; 35 деменцію, таку як, наприклад, хвороба Альцгеймера; мультиінфарктну деменцію; СНІД-асоційовану деменцію або лобно-скроневу деменцію. Нейродегенеративний розлад або стан включає дисфункції реакцій стріарних середніх шипикових нейронів.

Зокрема, розлади або стани, що включають як симптом синдром дефіциту уваги та/або порушення пізнавальної діяльності, включають деменцію, таку як хвороба Альцгеймера; 40 мультиінфарктну деменцію; деменцію, зумовлену хворобою із тільцями Леві; алкогольну деменцію або стійку деменцію, викликану вживанням певних речовин; деменцію, асоційовану із внутрішньочерепними пухлинами або черепно-мозковою травмою; деменцію, асоційовану із хворобою Хантінгтона; деменцію, асоційовану із хворобою Паркінсона; СНІД-асоційовану деменцію; деменцію, зумовлену хворобою Піка; деменцію, зумовлену хворобою Крейтцфельда-Якоба; інші захворювання, що включають делірій; амнестичний розлад; посттравматичний 45 стресовий розлад; інсульт; прогресуючий над'ядерний параліч; олігофренію; порушення здатності до навчання; синдром дефіциту уваги/гіперактивності (ADHD); помірний когнітивний розлад; синдром Аспергера; вікове когнітивне порушення та когнітивне порушення, пов'язане зі сприйняттям, увагою, навчанням або пам'яттю.

Зокрема, розлади, пов'язані із запам'ятовуванням і консолідацією пам'яті, включають 50 розлади пам'яті, як, наприклад, вікова втрата пам'яті, амнезія.

Переважно психотичний розлад вибраний із групи шизофренії, маніакальних розладів, шизоафективних розладів, шизофреноформних розладів та психотичного розладу, викликаного вживанням певних речовин.

Переважно розлад центральної нервової системи являє собою розлад особистості, вибраний із групи obsесивно-компульсивного розладу особистості та шизоїдного, шизотипічного 55 розладу.

Переважно розлад центральної нервової системи являє собою афективний розлад, вибраний із групи біполярних розладів (I та II типу), циклотимічного розладу, депресії, 60 дистимічного розладу, значного депресивного розладу; терапевтично резистентної депресії та



афективного розладу, викликаного вживанням певних речовин.

Переважаю розлад центральної нервової системи являє собою синдром дефіциту уваги/гіперактивності.

5 Переважаю розлад центральної нервової системи являє собою когнітивний розлад, вибраний із групи делірію, стійкого делірію, викликаного вживанням певних речовин, деменції, деменції, зумовленої ВІЛ-захворюванням, деменції, зумовленої хворобою Хантінгтона, деменції, зумовленої хворобою Паркінсона, деменції альцгеймерівського типу, стійкої деменції, викликаного вживанням певних речовин, та помірного когнітивного порушення.

10 Переважаю розлади, що підлягають лікуванню за допомогою сполук формули (I) або їхньої фармацевтично прийнятної солі або сольвату за даним винаходом, вибрані із шизофренії; обсессивно-компульсивного розладу; генералізованого тривожного розладу; хвороби Хантінгтона; дискінезії; хвороби Паркінсона; депресії; біполярних розладів; деменції, такої як хвороба Альцгеймера; синдрому дефіциту уваги/гіперактивності; наркотичної залежності; інсульти й аутизму.

15 Переважаю розлади, що підлягають лікуванню за допомогою сполук формули (I) або їхньої фармацевтично прийнятної солі або сольвату за даним винаходом, являють собою шизофренію, в тому числі її позитивні та негативні симптоми, а також порушення пізнавальних здібностей, таких як погіршення уваги або пам'яті.

20 Серед згаданих вище розладів особливе значення має лікування тривожності, обсессивно-компульсивного розладу, посттравматичного стресового розладу; генералізованого тривожного розладу, шизофренії, депресії, синдрому дефіциту уваги/гіперактивності, хвороби Альцгеймера, деменції, зумовленої хворобою Хантінгтона, деменції, зумовленої хворобою Паркінсона, деменції альцгеймерівського типу, стійкої деменції, викликаного вживанням певних речовин, та помірного когнітивного порушення.

25 Серед згаданих вище розладів особливе значення має лікування тривожності, обсессивно-компульсивного розладу, шизофренії, депресії, синдрому дефіциту уваги/гіперактивності та хвороби Альцгеймера.

Інші розлади центральної нервової системи включають тривожний розлад, асоційований із шизофренією, та коморбідну депресію і тривожність, зокрема значний депресивний розлад із коморбідним генералізованим тривожним розладом, соціальним тривожним розладом або панічним розладом; при цьому варто розуміти, що коморбідна депресія та тривожність також можуть позначатися термінами "депресія, що супроводжується тривожністю", "змішані тривожність та депресія", "змішаний тривожний та депресивний розлад" або "великий депресивний розлад із симптомами тривожності", які використовуються в даному документі без обмеження.

30 У даний час у четвертому виданні Посібника з діагностики та статистики психічних розладів (DSM-IV) Американської психіатричної асоціації представлений спосіб діагностики для ідентифікації розладів, описаних у даному документі. Фахівцю у даній галузі буде зрозуміло, що для неврологічних і психічних розладів, описаних у даному документі, існують альтернативні системи номенклатури, нозологічні підходи та системи класифікації, і що вони видозмінюються разом із прогресом у галузі медицини та науковим прогресом. Наприклад, в "American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013" (DSM-5™) використовуються такі терміни, як депресивні розлади, зокрема значний депресивний розлад, стійкий депресивний розлад (дистимія), депресивний розлад, викликаний вживанням певних речовин/лікарських препаратів; нейрокогнітивні розлади (NCD) (як важкі, так і легкі), зокрема нейрокогнітивні розлади, зумовлені хворобою Альцгеймера, судинний NCD (такий як судинний NCD, що проявляється у вигляді множинних інфарктів), NCD, зумовлений ВІЛ-інфекцією, NCD, зумовлений травматичним пошкодженням головного мозку (TBI), NCD, зумовлений хворобою Паркінсона, NCD, зумовлений хворобою Хантінгтона, лобно-скроневий NCD, NCD, зумовлений пріонною хворобою, та NCD, викликане вживанням певних речовин/лікарських препаратів; порушення нервово-психічного розвитку, зокрема інтелектуальне порушення, специфічне порушення здатності до навчання, порушення нервово-психічного розвитку рухових функцій, комунікативний розлад і синдром дефіциту уваги та гіперактивності (ADHD); розлади, пов'язані зі вживанням певних речовин, та адиктивні розлади, зокрема розлад, пов'язаний зі вживанням алкоголю, розлад, пов'язаний зі вживанням амфетаміну, розлад, пов'язаний зі вживанням марихуани, розлад, пов'язаний зі вживанням кокаїну, розлад, пов'язаний зі вживанням інших галюциногенних речовин, розлад, пов'язаний зі вживанням тютюну, розлад, пов'язаний зі вживанням опіоїдів, і розлад, пов'язаний зі вживанням фенциклідину; розлади шизофренічного спектра та інші психотичні розлади, зокрема шизофренія, шизофреноформний розлад,

шизоафективний розлад, маніакальний розлад, короткочасний психотичний розлад, психотичний розлад, викликаний вживанням певних речовин/лікарських препаратів; та циклотимічний розлад (який згідно з DSM-5™ потрапляє під категорію біполярних і споріднених із ними розладів). Такі терміни можуть застосовуватися фахівцем у даній галузі як альтернативна номенклатура для деяких захворювань або станів, які згадуються в даному документі. Додаткове порушення нервово-психічного розвитку включає розлад аутистичного спектра (ASD), який згідно з DSM-5™ охоплює розлади, раніше відомі під термінами ранній дитячий аутизм, дитячий аутизм, аутизм Каннера, високофункціональний аутизм, атипічний аутизм, первазивний розлад розвитку без додаткових уточнень, дезінтегративний розлад дитячого віку та синдром Аспергера.

Таким чином, даний винахід також стосується сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом для застосування у лікуванні будь-якого із вищезгаданих у даному документі захворювань.

Даний винахід також стосується сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом для застосування у лікуванні будь-якого із вищезгаданих у даному документі захворювань.

Даний винахід також стосується сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом для лікування або попередження, зокрема лікування, будь-якого із вищезгаданих у даному документі захворювань.

Даний винахід також стосується застосування сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом для виготовлення лікарського препарату для лікування або попередження будь-якого із вищезгаданих у даному документі хворобливих станів.

Даний винахід також стосується застосування сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом для виготовлення лікарського препарату для лікування будь-якого із вищезгаданих у даному документі хворобливих станів.

Сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль або сольват за даним винаходом можна вводити ссавцям, переважно людям, для лікування або попередження будь-якого із вищезгаданих у даному документі захворювань.

З огляду на користь сполуки 1 або її фармацевтично прийнятних солі або сольвату згідно з даним винаходом передбачений спосіб лікування вищезгаданого у даному документі розладу або захворювання, що передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, або фармацевтичних композицій, описаних у даному документі.

Указані способи передбачають введення, тобто системне або місцеве введення, переважно пероральне введення, терапевтично ефективної кількості сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом теплокровним тваринам, у тому числі людям.

Таким чином, даний винахід також стосується способу попередження та/або лікування будь-якого із вищезгаданих у даному документі захворювань, що передбачає введення терапевтично ефективної кількості сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату згідно з даним винаходом пацієнту, який потребує цього.

Описаний у даному документі інгібітор PDE2 можна застосовувати окремо, в комбінації або в комбінації з іншими фармацевтичними засобами, такими як інші засоби, що застосовуються у лікуванні психозів, таких як шизофренія та біполярний розлад, obsесивно-компульсивний розлад, хвороба Паркінсона, когнітивне порушення та/або втрата пам'яті, наприклад, агоністи нікотинінових ацетилхолінових рецепторів  $\alpha$ -7, інгібітори PDE4 (роліпрам, GEBR-7b, GSK356278, GSK256066, апреміласт, МК-0952, рофлуміласт, AN2898, AN2728, Ariflo (циломіласт), дотраверин, рономіласт (елбіміласт), реваміласт, тетоміласт, E6005, GDP-1116, HT0712, МК-0873), інгібітори PDE5 (силденафіл, варденафіл, тадалафіл, уденафіл, аванафіл, міроденафіл, лоденафіл, дазантафіл, PF-00489791), PDE9 (PF-04447943), інші інгібітори PDE2 (Bay 60-7550, PF-999, ND-7001), інгібітори PDE10 (PF-02545920, AMG579), інгібітори PDE2 та 10, блокатори кальцієвих каналів, модулятори мускаринових ацетилхолінових рецепторів m1 та m2, модулятори аденозинових рецепторів, ампакини, модулятори NMDA-R, модулятори mGluR, модулятори дофамінових рецепторів, модулятори серотонінових рецепторів, модулятори канабіноїдних рецепторів, інгібітори HDAC (вориностат (SAHA), панобіностат, квзіностат, вальпроева кислота) та інгібітори холінестерази (наприклад, донепезил, ривастигмін та галантамін). У випадку таких комбінацій сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль або сольват за даним винаходом можна використовувати в комбінації з одним або декількома іншими лікарськими засобами у лікуванні, попередженні, контролі, зменшенні інтенсивності

вияву або зниженні ризику розвитку захворювань або станів, щодо яких сполука 1 або інші лікарські засоби можуть бути корисними, при цьому комбінація лікарських засобів разом є безпечнішою або ефективнішою, ніж кожний із лікарських засобів окремо.

Фахівцю у даній галузі буде зрозуміло, що терапевтично ефективною кількістю інгібітора PDE2 за даним винаходом є кількість, достатня для інгібування ферменту PDE2, і що ця кількість варіює, окрім іншого, залежно від типу захворювання, концентрації сполуки у терапевтичному складі та стану пацієнта. Зазвичай кількість інгібітора PDE2, що підлягає введенню як терапевтичний засіб для лікування захворювань, за яких інгібування ферменту PDE2 є доцільним, таких як розлади, описані у даному документі, буде визначатися у кожному конкретному випадку лікарем.

Придатною дозою зазвичай є доза, яка дає у результаті концентрацію інгібітора PDE2 у ділянці, що оброблюється, в діапазоні від 0,5 нМ до 200 мкМ та в більш типовому випадку від 5 нМ до 50 мкМ. Для досягнення цих лікувальних концентрацій пацієнту, який потребує лікування, ймовірно будуть вводити від 0,001 мг/кг до 15 мг/кг ваги тіла, зокрема від 0,01 мг/кг до 2,50 мг/кг ваги тіла, зокрема від 0,01 до 1,5 мг/кг ваги тіла, зокрема від 0,1 мг/кг до 0,50 мг/кг ваги тіла. Кількість сполуки згідно з даним винаходом, яка також називається у даному документі активним інгредієнтом, необхідна для досягнення терапевтичного ефекту, буде, звісно, змінюватися у кожному конкретному випадку, змінюватися залежно від конкретної сполуки, шляху введення, віку та стану пацієнта, який одержує лікування, та конкретного розладу або захворювання, що підлягає лікуванню. Спосіб лікування може також передбачати введення активного інгредієнта згідно зі схемою від одного до чотирьох уведень на добу. У таких способах лікування сполуку згідно з даним винаходом переважно складають перед введенням. Як описано в даному документі нижче, придатні фармацевтичні складки одержують за допомогою відомих процедур із застосуванням добре відомих і загальнодоступних інгредієнтів.

#### Фармацевтичні композиції

У даному винаході також передбачені композиції для попередження або лікування захворювань, за яких інгібування PDE2 є доцільним, таких як неврологічні та психічні розлади. Указані композиції містять терапевтично ефективну кількість сполуки 1 та фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.

Хоча активний інгредієнт можна вводити окремо, переважно, щоб він був представлений у вигляді фармацевтичної композиції. Відповідно, в даному винаході додатково передбачена фармацевтична композиція, яка містить сполуку згідно з даним винаходом разом із фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем. Носій або розріджувач повинні бути "прийнятними" з погляду на сумісність із іншими інгредієнтами композиції і не повинні бути шкідливими для пацієнтів, які його одержують.

Фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть бути одержані будь-якими способами, добре відомими в галузі фармацевтики. Терапевтично ефективна кількість конкретної сполуки, у формі основи або у формі солі приєднання, як активний інгредієнт об'єднують в однорідну суміш із фармацевтично прийнятним носієм, який може набувати ряд форм залежно від форми препарату, необхідної для введення. Бажано, щоб ці фармацевтичні композиції знаходилися в стандартній лікарській формі, переважно придатній для системного введення, такого як пероральне, підшкірне або парентеральне введення; або для місцевого введення, як, наприклад, за допомогою інгаляції, назального спрею, крапель для очей або за допомогою крему, гелю, шампуню тощо. Наприклад, під час одержання композицій у вигляді лікарської форми для перорального введення можна використовувати будь-які звичайні фармацевтичні середовища, такі як, наприклад, вода, гліколі, масла, спирти тощо, у випадку рідких препаратів для перорального введення, таких як суспензії, сиропи, настойки та розчини; або тверді носії, такі як крохмалі, цукри, каолін, змащувальні речовини, зв'язувальні речовини, розпушувачі тощо, у випадку порошків, пілюль, капсул і таблеток. Завдяки своїй простоті введення таблетки та капсули являють собою найбільш переважні стандартні лікарські форми для перорального введення, у випадку яких, безумовно, використовують тверді фармацевтичні носії. У випадку композицій для парентерального введення носій, як правило, щонайменше значною мірою буде містити стерильну воду, хоча може містити й інші інгредієнти, наприклад, для поліпшення розчинності. Наприклад, можна одержувати розчини для ін'єкцій, в яких носій містить фізіологічний розчин, розчин глюкози або суміш фізіологічного розчину та розчину глюкози. Також можна одержувати суспензії для ін'єкцій, у випадку яких можуть застосовуватися відповідні рідкі носії, суспендувальні засоби тощо. У композиціях, придатних для підшкірного введення, носій необов'язково містить засіб, який поліпшує проникнення, та/або придатний змочувальний засіб, необов'язково в комбінації з придатними добавками будь-якої природи в мінімальних пропорціях, при цьому добавки не чинять жодних суттєвих шкідливих впливів на

шкіру. Указані добавки можуть полегшувати введення через шкіру та/або можуть бути корисними під час одержання необхідних композицій. Ці композиції можна вводити різними шляхами, наприклад, за допомогою трансдермального пластиру, шляхом точкового нанесення або у вигляді мазі.

Особливо переважно для простоти введення та однорідності дозування складати вищезгадані фармацевтичні композиції у вигляді стандартної лікарської форми. Стандартні лікарські форми в контексті даного опису та формули винаходу стосуються фізично дискретних одиниць, придатних як одиниці дозування, при цьому кожна одиниця містить попередньо визначену кількість активного інгредієнта, розраховану для одержання необхідного терапевтичного ефекту, в поєднанні з необхідним фармацевтичним носієм. Прикладами таких стандартних лікарських форм є таблетки (у тому числі подільні таблетки або таблетки, вкриті оболонкою), капсули, пілюлі, пакети з порошкоподібним продуктом, пластинки, розчини або суспензії для ін'єкцій, чайні ложки з горою, столові ложки з горою тощо, а також їхні окремі кратні кількості.

Залежно від способу введення фармацевтична композиція буде містити від 0,05 % до 99 % за вагою, переважно від 0,1 % до 70 % за вагою, більш переважно від 0,1 % до 50 % за вагою активного інгредієнта та від 1 % до 99,95 % за вагою, переважно від 30 % до 99,9 % за вагою, більш переважно від 50 % до 99,9 % за вагою фармацевтично прийнятного носія, при цьому всі значення відсоткового вмісту наводяться із розрахунку на загальну вагу композиції.

Сполуку за даним винаходом можна застосовувати для системного введення, такого як пероральне, підшкірне або парентеральне введення; або для місцевого введення, як, наприклад, за допомогою інгаляції, назального спрею, крапель для очей або за допомогою крему, гелю, шампуню тощо. Сполуку переважно вводять перорально.

Точне дозування та частота введення залежать від сполуки, конкретного стану, що підлягає лікуванню, тяжкості стану, що підлягає лікуванню, віку, ваги, статі, ступеня вираження розладу та загального фізичного стану конкретного пацієнта, а також від іншого медикаментозного лікування, яке індивідум може одержувати, що добре відомо фахівцям у даній галузі. Окрім того, очевидно, що вказана ефективна добова кількість може бути знижена або збільшена залежно від реакції суб'єкта, що підлягає лікуванню, та/або залежно від оцінки лікаря, що призначає сполуку за даним винаходом.

Кількість сполуки 1, яку можна об'єднувати із матеріалом носія для одержання лікарської форми з однократним дозуванням, буде варіювати залежно від захворювання, що підлягає лікуванню, виду ссавця та конкретного способу введення. Однак як загальна вказівка придатні стандартні дози сполуки за даним винаходом можуть, наприклад, переважно містити від 0,1 мг до приблизно 1000 мг активної сполуки. Переважна стандартна доза становить від 1 мг до приблизно 500 мг. Більш переважна стандартна доза становить від 1 мг до приблизно 300 мг. Ще більш переважна стандартна доза становить від 1 мг до приблизно 100 мг. Такі стандартні дози можна вводити більш ніж один раз на добу, наприклад 2, 3, 4, 5 або 6 разів на добу, але переважно 1 або 2 рази на добу з тим, щоб загальне дозування для дорослої людини вагою 70 кг перебувало в діапазоні від 0,001 до приблизно 15 мг на кг ваги суб'єкта із розрахунку на одне введення. Переважне дозування становить від 0,01 до приблизно 1,5 мг на кг ваги суб'єкта із розрахунку на одне введення, і така терапія може продовжуватися протягом декількох тижнів або місяців, а в деяких випадках протягом декількох років. Однак слід розуміти, що певний рівень дози для будь-якого конкретного пацієнта буде залежати від ряду факторів, у тому числі від активності певної використовуваної сполуки; віку, ваги тіла, загального стану здоров'я, статі та режиму харчування індивідума, що підлягає лікуванню; часу та шляху введення; швидкості виведення; інших лікарських засобів, які були введені раніше; та тяжкості конкретного захворювання, яке піддається терапії, що добре зрозуміло фахівцям у даній галузі.

Типове дозування може являти собою одну таблетку з дозою від 1 мг до приблизно 100 мг або від 1 мг до приблизно 300 мг, яку приймають один раз на добу або декілька разів на добу, або одну капсулу або таблетку зі сповільненим вивільненням, яку приймають один раз на добу та яка характеризується пропорційно вищим вмістом активного інгредієнта. Ефекту сповільненого вивільнення можна досягти за допомогою матеріалів капсули, які розчиняються за різних значень рН, за допомогою капсул із повільним вивільненням за осмотичного тиску або за допомогою будь-яких інших відомих засобів, що забезпечують контрольоване вивільнення.

У деяких випадках може знадобитися застосування дозувань поза цими діапазонами, що буде очевидно фахівцям у даній галузі. Окрім того, слід відзначити, що клініцист або особистий лікар будуть знати, як і коли починати, переривати, коригувати або закінчувати терапію відповідно до реакції окремого пацієнта.

Щодо композицій, способів і наборів, наведених вище, фахівцю в даній галузі буде

зрозуміло, що переважною сполукою для застосування в кожному із них є сполука, вказана в даному документі.

#### Експериментальна частина

Використовуваний у даному документі термін "ACN" означає ацетонітрил, "AcOH" означає оцтову кислоту, "DMAP" означає 4-диметиламінопіридин, "DSC" означає диференціальну сканувальну калориметрію, "LCMS" означає рідинну хроматографію/мас-спектрометрію, "HPLC" означає високоефективну рідинну хроматографію, "RP HPLC" означає високоефективну рідинну хроматографію з оберненою фазою, "водн." означає водний, "DCM" означає дихлорметан, "DIPE" означає диізопропіловий етер, "DIPEA" означає диізопропілетиламін, "DMF" означає N,N-диметилформамід, "EtOH" означає етанол, "Et<sub>2</sub>O" означає діетиловий етер, "EtOAc" означає етилацетат, "Et<sub>3</sub>N" означає триетиламін, "HBTU" означає O-(бензотриазол-1-іл)-N,N'-дметилтетраметилурион гексафторфосфат, "THF" означає тетрагідрофуран, "хв." означає хвилини, "год." означає години, "MeOH" означає метанол, "iPrOH" означає 2-пропанол, "реак. сум." означає реакційну суміш, "RT" означає кімнатну температуру, "орг. ш." означає органічний шар, "R<sub>i</sub>" означає час утримання (в хвилинах), "кільк." означає кількісний, "насич." означає насичений, "розч." означає розчин, "т. пл." означає температуру плавлення, "q.s." означає в достатній кількості.

Тонкошарову хроматографію (TLC) проводили на пластинках із шаром силікагелю 60 F254 (Merck) із застосуванням розчинників із високим ступенем чистоти. Хроматографію на відкритих колонках проводили на силікагелі з розміром частинок 230-400 меш і розміром пор 60 Å (Merck) відповідно до стандартних методик. Автоматизовану колонкову флеш-хроматографію проводили із застосуванням готових до підключення картриджів від Merck на силікагелі з частинками неправильної форми з розміром частинок 15-40 мкм (одноразові колонки для нормально-фазової флеш-хроматографії) у системі SPOT або LAFLASH від Armen Instrument.

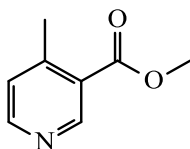
Абсолютну стереохімічну конфігурацію для деяких сполук визначали за допомогою коливального кругового дихроїзму (VCD). Їх вимірювали на Bruker Equinox 55, обладнаному PMA 37, в рідинній кюветі з вікном із KBr із використанням CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> як розчинника (PEM: 1350 см<sup>-1</sup>, LIA: 1 мВ, роздільна здатність: 4 см<sup>-1</sup>). Опис застосування VCD для визначення абсолютної конфігурації можна знайти в Dyatkin A.B. et. al, Chirality, 14:215-219 (2002).

Розрахунки ab initio: ретельний пошук щодо конформації виконували на рівні молекулярної механіки із застосуванням MacroModel для здійснення відбору зразків за змішаного торсійного/низькочастотного режиму з силовим полем OPLS-2005. Локалізовані мінімуми оптимізували із застосуванням Jaguar на рівні B3LYP/6-31G\*\* у межах континуальної моделі сольватації Пуассона-Больцмана для імітації розчинника дихлорметану. Усі конформації всередині інтервалу 10 кДж/моль застосовували для моделювання спектра VCD та IR-спектра. Дипольні сили та сили обертання розраховували за того ж рівня B3LYP/6-31G\*\* із застосуванням Jaguar. Розраховані спектри VCD, одержані після масштабування частот у 0,97 разів, із перетворенням Лоренца на форму смуг та підсумовуванням внеску кожного конформера, враховуючи ансамбль Больцмана, візуально порівнювали з експериментальними спектрами для визначення точної стереохімії.

Наступні приклади призначені для ілюстрації, а не для обмеження обсягу даного винаходу. Якщо не вказано інше, усі вихідні матеріали одержували від комерційних постачальників і застосовували без додаткового очищення.

#### А. Синтез проміжних сполук

##### Проміжна сполука 1

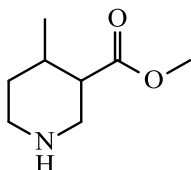


Процедура а. Гідрохлорид 4-метил-3-піридинкарбонової кислоти (1:1) (40 г, 230,4 моль) додавали у нагріту зі зворотним холодильником суміш сірчаної кислоти (20 мл) та MeOH (400 мл). Суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом ночі, потім її випарювали та одержану завісь додавали до холодного розчину NaHCO<sub>3</sub> (64 г) у воді (360 мл). Продукт екстрагували за допомогою DCM й органічний шар висушували над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували та випарювали з одержанням проміжної сполуки 1 (28,70 г, 83 %).

Процедура б. У металевий реактор завантажували 3-бром-4-метилпіридин (200 г, 0,116 моль) та суміш DMF/MeOH (1 л/1 л). До цієї суміші додавали Et<sub>3</sub>N (400 г, 0,395 моль), ацетат паладію (II) (8 г, 0,036 моль) та 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен (16 г, 0,029 моль). Реактор закривали та подавали газ CO (3 МПа) і реакційну суміш змішували та нагрівали протягом ночі

за 140 °С. Реак. сум. охолоджували, фільтрували та концентрували in vacuo. Залишок очищували за допомогою колонкової флеш-хроматографії на силікагелі (градієнт елюента: EtOAc/петролейний етер від 1/1 до 1/0). Фракції, що містять продукт, збирали та розчинник випарювали з одержанням необхідної проміжної сполуки 1 (90 г, 51 %).

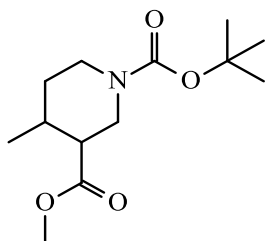
5 Проміжна сполука 2



Процедура а. У колбу для гідрування завантажували AcOH (500 мл) і потім додавали PtO<sub>2</sub> (15,02 г, 66,2 моль). Додавали проміжну сполуку 1 (50 г, 330,8 моль) і суміш гідрували за 50°C протягом 7 днів. Реак. сум. фільтрували через dicalite® та фільтрат випарювали з одержанням проміжної сполуки 2 (52 г), яку застосовували на наступній стадії без додаткового очищення.

10 Процедура b. До розчину проміжної сполуки 1 (90 г, 0,595 моль) та AcOH (1 л) додавали оксид платини (5 г, 0,022 моль). Реак. сум. перемішували та гідрували протягом 5 днів за 50 °С за тиску 3,5 кПа. Охолоджену реак. сум. концентрували in vacuo з одержанням проміжної сполуки 2 у вигляді солі оцтової кислоти (140 г, 97 %, 90 % чистота, визначена за допомогою <sup>1</sup>H-ЯМР).

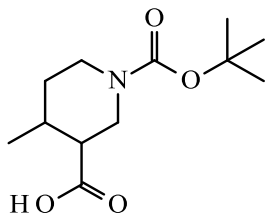
15 Проміжна сполука 3



Процедура а. До розчину проміжної сполуки 2 (52 г, 330,8 моль) у DCM (869 мл) додавали DIPEA (85,5 г, 661,5 моль) та DMAP (4,04 г, 33,08 моль). Потім до цього розчину маленькими частинами додавали ди-трет-бутилдикарбонат (72,19 г, 330,8 моль) і реакційну суміш змішували за RT протягом 1 год. Реак. сум. промивали водою та сольовим розчином й органічний шар висушували над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували та випарювали. Продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії (силікагель, елюент: DCM, 1 % MeOH в DCM, 2 %, 4 %). Необхідні фракції випарювали з одержанням проміжної сполуки 3 (64,1 г, 75 %).

25 Процедура b. До перемішаного й охолодженого (0 °С) розчину проміжної сполуки 2 (140 г, 0,595 моль) у DCM (1,5 л) послідовно додавали ди-трет-бутилдикарбонат (130 г, 0,596 моль), Et<sub>3</sub>N (225 г, 1,74 моль) та DMAP (10 г, 0,082 моль) і перемішування продовжували за RT протягом 2 год. Реакційну суміш виливали в H<sub>2</sub>O (500 мл) та екстрагували за допомогою DCM (2 × 100 мл). Органічні шари відділяли, висушували (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) та розчинник випарювали з одержанням неочищеної проміжної сполуки 3 (150 г, 90 %, 90 % чистота, визначена за допомогою <sup>1</sup>H-ЯМР), яку застосовували як таку на наступній стадії.

30 Проміжна сполука 4

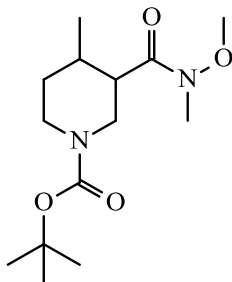


35 Процедура а. Проміжну сполуку 3 (64,1 г, 249,1 моль) перемішували в MeOH (500 мл) за RT. Додавали NaOH (2 М, 747,3 мл) і суміш перемішували протягом 2 год. за RT. Реак. сум. підкислювали 1 н. HCl і продукт екстрагували за допомогою Et<sub>2</sub>O. Орг. ш. промивали сольовим розчином і висушували над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували та випарювали з одержанням проміжної сполуки 4 (59,70 г) у вигляді білої твердої речовини.

40 Процедура b. До змішаного розчину проміжної сполуки 3 (150 г, 90 % чистота, 0,524 моль) у MeOH (0,9 л) додавали 2 М розчин NaOH (1,8 моль). Через 14 год. за RT реак. сум. екстрагували за допомогою MTBE (2 × 0,8 л). Водний шар підкислювали 10 % лимонною

кислотою та потім екстрагували за допомогою EtOAc (4 × 1 л). Об'єднані органічні шари висушували над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фільтрували та концентрували in vacuo з одержанням неочищеної проміжної сполуки 4 (142 г, 90 % чистота, визначена за допомогою <sup>1</sup>H-ЯМР, 100 %), яку застосовували як таку на наступній стадії.

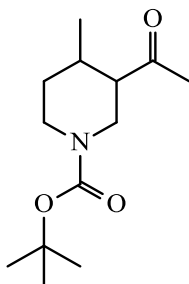
5 Проміжна сполука 5



Процедура а. До розчину проміжної сполуки 4 (59,7 г, 0,25 моль) у THF (800 мл) додавали ді-1Н-імідазол-1-ілметанон (54 г, 0,33 моль) і суміш перемішували за RT протягом 1 год. В іншій колбі до суспензії N-метоксиметанаміну гідрохлориду (1:1) (32,93 г, 0,34 моль) в ACN (500 мл) додавали триметиламін (35,75 г, 0,35 моль). Обидві суміші об'єднували та перемішували за 50°C, здійснюючи при цьому контроль. Проміжний продукт кристалізували із реак. сум. і він не вступав у реакцію з N-метоксиметанаміном для утворення необхідного продукту. Додавали DCM доти, доки проміжна сполука не розчиниться. Реакційну суміш залишали перемішуватися протягом 1 тижня за 80°C. Розчинники випарювали. Залишок розчиняли в DCM та промивали водою, 20 % розчином AcOH і в решті насиченим розчином NaHCO<sub>3</sub>. Органічний шар висушували над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували та випарювали. Продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії (силікагель, елюент: 2 % MeOH в DCM, 4 %). Очищені фракції випарювали з одержанням проміжної сполуки 5 (70 г, кількісно).

Процедура б. До змішаного та охолодженого льодом розчину проміжної сполуки 4 (140 г, 0,518 моль) в DCM (2 л) додавали N, O-диметилгідроксиламін (113 г, 1,16 моль) та Et<sub>3</sub>N (113 г, 1,79 моль). Потім додавали HATU (235 г, 0,618 моль) та перемішування продовжували протягом 14 год. Розчинник випарювали та додавали розчин NaHCO<sub>3</sub> (0,5 л) і потім екстрагували за допомогою DCM (3 × 1 л). Об'єднані органічні шари відділяли, висушували над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фільтрували та концентрували in vacuo. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі з елюванням за допомогою 1-10 % EtOAc у петролейному етері з одержанням проміжної сполуки 5 (152 г, 100 %).

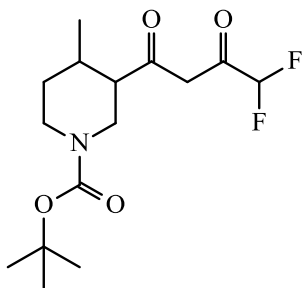
Проміжна сполука 6



Процедура а. Проміжну сполуку 5 (70 г, 244,4 моль) у THF (250 мл) завантажували у колбу в атмосфері N<sub>2</sub> й охолоджували до -15 °C. Краплями додавали бромід метилмагнію (1,4 М у толуолі/THF 75/25, 206 мл) за температури, що не перевищує 0 °C. Після додавання реак. сум. перемішували за RT протягом 1 год. Потім реак. сум. виливали на лід із 20 мл AcOH. Продукт екстрагували за допомогою Et<sub>2</sub>O й органічний шар промивали за допомогою 5 % розчину NaHCO<sub>3</sub>. Органічний шар висушували над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували та випарювали з одержанням проміжної сполуки 6 (53,35 г, 90 %).

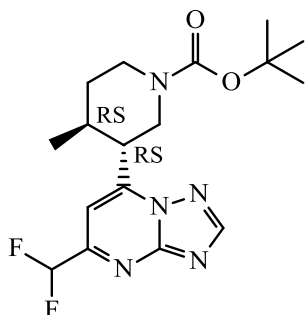
Процедура б. До перемішаного й охолодженого розчину (0 °C) проміжної сполуки 5 (150 г, 0,524 моль) в THF (2 л) краплями додавали 3 М розчин бромиду метилмагнію в THF (0,75 л, 2,25 моль) та перемішування продовжували за RT протягом 2 год. Реакційну суміш виливали у водний розчин NH<sub>4</sub>Cl та екстрагували за допомогою DCM. Об'єднані органічні шари висушували над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фільтрували та концентрували in vacuo. Залишок очищали за допомогою хроматографії на силікагелі з елюванням за допомогою 1-5 % EtOAc у петролейному етері з одержанням проміжної сполуки 6 (120 г, 95 %).

Проміжна сполука 7



Проміжну сполуку 6 (53,35 г, 0,22 моль) перемішували в толуолі (1500 мл) за 0°C в атмосфері N<sub>2</sub>. Додавали трет-бутоксид калію (34,14 г) за 0-5°C, краплями додавали етиловий естер 2,2-дифтороцтової кислоти (33,01 г, 0,27 моль) за 0-5°C. Реак. сум. перемішували за RT протягом 2 год., потім промивали за допомогою 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> у воді й органічний шар висушували над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували та випарювали з одержанням проміжної сполуки 7 (70,50 г, кількісно).

Проміжна сполука 8



Проміжну сполуку 7 (70,5 г, 220,8 моль), 1H-1,2,4-триазол-5-аміну гідрохлорид (1:1) (53,22 г, 441,52 моль) та DMF (1500 мл) перемішували за 80°C протягом 24 год. Додавали Et<sub>3</sub>N (20 г) та ди-трет-бутилдикарбонат (20 г). Суміш перемішували протягом 30 хв., випарювали та потім розчиняли в EtOAc, промивали водою та сольовим розчином. Органічний шар висушували над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували та випарювали. Спостерігали чотири ізомери. Першу фракцію кристалізували з Et<sub>2</sub>O. Кристали відфільтровували та висушували з одержанням проміжної сполуки 8 (24,60 г, 30 %). Із маточного розчину одержували другу фракцію сполуки. Кристали відфільтровували та висушували з одержанням проміжної сполуки 8 (2,53 г, 3 %).

Примітка: "RS" означає, що проміжна сполука являє собою рацемічну суміш двох енантіомерів із відносною транс-конфігурацією.

Проміжні сполуки 9, 9a та 9b

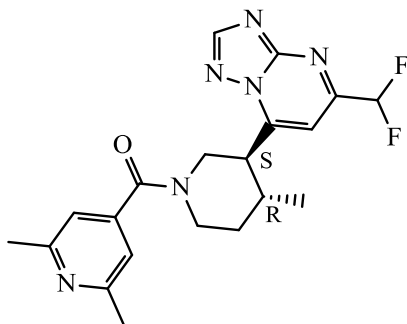
Проміжна сполука 9	Проміжна сполука 9a	Проміжна сполука 9b

До розчину проміжної сполуки 8 (24,6 г, 67 моль) у MeOH (350 мл) додавали HCl-iPrOH (350 мл) та реак. сум. перемішували протягом 2 год. за RT. Реак. сум випарювали та продукт кристалізували з EtOH. Кристали відфільтровували та висушували з одержанням 20,33 г неочищеної речовини, до якої додавали воду, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> та DCM. Органічний шар висушували над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували та випарювали з одержанням 12,80 г проміжної сполуки 9. Цю вільну основу розділяли на енантіомери 9a та 9b шляхом очищення за допомогою препаративної SFC (нерухома фаза: Chiralpak Diacel AD 30 × 250 мм; рухома фаза: CO<sub>2</sub>, ((MeOH-iPrOH 50/50) з 0,4 % iPrNH<sub>2</sub>) з одержанням проміжної сполуки 9a (5 г, 19 %, R<sub>t</sub>=7,57 хв.) та проміжної сполуки 9b (5,13 г, 19 %, R<sub>t</sub>=9,36 хв.).



Проміжні сполуки 9a та 9b виділяли у вигляді вільних основ, або, альтернативно, їх розчиняли в MeOH із наступним додаванням HCl/i-PrOH і випарюванням суміші. Хлористоводневі солі (у кожному випадку.HCl) кристалізували з ACN, відфільтровували та висушували.

5 В. Синтез кінцевої сполуки  
Сполука 1



2,6-Диметилпіридин-4-карбонову кислоту (1,84 г, 12,2 моль) перемішували в DCM (100 мл), додавали DIPEA (6,31 г, 48,8 моль) та HBTU (4,63 г, 12,2 моль), перемішування продовжували протягом 0,5 год. за RT. До розчину додавали проміжну сполуку 9b (3,26 г, 12,2 моль) та перемішування продовжували протягом 5 год. за RT. Додавали 1 н. розчин NaOH та перемішували протягом 5 хв. Органічний шар відділяли, висушували над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували та випарювали. Продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії (силікагель, елюент: 1 % MeOH у DCM, 2 %, 4 %). Очищені фракції випарювали та продукт кристалізували із DIPE, відфільтровували та висушували з одержанням сполуки 1 (3,85 г, 79 %).

Окрему партію сполуки кристалізували у вигляді солі HCl із Et<sub>2</sub>O з одержанням сполуки 1 у вигляді хлористоводневої солі (.2 HCl) (вихід: 175 мг, 70 %, починаючи з 175 мг проміжної сполуки 9b.HCl).

20 Стереохімічну конфігурацію сполуки 1 підтверджували за допомогою коливального кругового дихроїзму (VCD).

Аналітична частина

Значення температури плавлення

25 Значення являють собою або максимальні значення, або діапазони значень температури плавлення, і їх одержують із експериментальними похибками, які зазвичай пов'язані з цим аналітичним способом.

DSC823e (позначений як DSC)

Температуру плавлення визначали за допомогою DSC823e (Mettler-Toledo). Температуру плавлення вимірювали за температурного градієнту 10 °C/хв. Максимальна температура становила 300 °C.

Таблиця 1

№ спол.	Т. пл.
1	149,31

Кут оптичного обертання

Кут оптичного обертання вимірювали на поляриметрі Perkin-Elmer 341 із натрієвою лампою та позначали наступним чином: [α]<sup>o</sup> (λ, с у г/100 мл, розчинник, Т у °C).

35 [α]<sub>λ</sub><sup>T</sup> = (100α)/(l × c): де l означає довжину пробігу в дм, а c означає концентрацію у г/100 мл для зразку за температури Т (°C) і довжини хвилі λ (в нм). Якщо використовується довжина хвилі світла становить 589 нм (D-лінія натрію), то замість неї можна використовувати символ D. Завжди має наводитися знак напрямку обертання (+ або -). У випадку застосування цього рівняння концентрацію та розчинник завжди наводять у круглих дужках після кута обертання.

40 Кут обертання вказують у градусах, а одиниці концентрації не наводять (вважають, що вони виражені в г/100 мл).

Таблиця 2

№ спол.	Кут опт. оберт.
1	+28,91° (589 нм, с 0,2975 ваг./об. %, DMF, 20 °C)

## Способи SFC-MS

- 5 Вимірювання під час SFC проводили із застосуванням аналітичної системи надкритичної рідинної хроматографії, укомплектованої насосом для двокомпонентних сумішей для доставки діоксиду вуглецю (CO<sub>2</sub>) та модифікатором, автоматичним дозатором, термостатом для колонок, детектором на діодній матриці, оснащеним проточною кюветою для роботи під високим тиском, що витримує значення до 400 бар. За умови оснащення мас-спектрометром (MS) потік із колонки спрямовували до (MS). У компетенції фахівця в даній галузі є налаштування регульованих параметрів (наприклад, діапазону сканування, часу витримки тощо) з метою одержання іонів, які забезпечують визначення номінальної моноізотопної молекулярної маси (MW) сполуки. Збір і обробку даних виконували за допомогою відповідного програмного забезпечення.

Таблиця 3а

Аналітичні способи SFC-MS (швидкість потоку виражена у мл/хв.; температура колонки (T) у °C; протитиск (BPR) у барах).

Код способу	Колонка	Рухома фаза	Гradient	Швидкість потоку ----- T колонки	Час аналізу ----- BPR
1	Колонка Daicel (AD, OD, OJ, AS, ID)-H-H (5,0 мкм, 250 × 4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: 5 різних розчинників, що використовуються для B: MeOH, EtOH, iPrOH, MeOH-iPrOH (50-50) та EtOH-iPrOH (50-50)	10 %-55 % B за 4 хв., 55-50 % за 0,45 хв., утримування 2,55 хв.	5 ----- 40	7 ----- 110

15

Таблиця 3б

Аналітичні дані SFC – R<sub>t</sub> означає час утримування (у хвиликах), [M+H]<sup>+</sup> означає масу протонованої сполуки, спосіб стосується способу, що застосовується для аналізу енантіомерно чистих сполук за допомогою (SFC)MS

№ спол.	R <sub>t</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Спосіб	Порядок елювання ізомерів
1	2,93	401	1	Тільки один енантіомер

## Способи LC/MS

- 20 Вимірювання під час здійснення вискоефективної рідинної хроматографії (HPLC) проводили за допомогою насоса для LC, детектора на діодній матриці (DAD) або УФ-детектора та колонки, як описано у відповідних способах. За необхідності включали додаткові детектори (див. наведену нижче таблицю способів).

- 25 Потік із колонки спрямовували до мас-спектрометра (MS), який був оснащений джерелом іонізації за атмосферного тиску. У компетенції фахівця в даній галузі є налаштування регульованих параметрів (наприклад, діапазону сканування, часу витримки тощо) з метою одержання іонів, які забезпечують визначення номінальної моноізотопної молекулярної маси (MW) сполуки. Збір і обробку даних виконували за допомогою відповідного програмного забезпечення.

- 30 Сполуки описували за допомогою їхніх значень експериментального часу утримування (R<sub>t</sub>) та іонів. Якщо не вказано інше, то в таблиці даних вказаний молекулярний іон відповідає [M+H]<sup>+</sup> (протонована молекула) та/або [M-H]<sup>-</sup> (депротонована молекула). У випадку, якщо сполука не була безпосередньо здатна до іонізації, вказують тип аддукту (тобто [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, [M+HCOO]<sup>-</sup>

тощо). Для молекул зі складними ізотопними розподілами (Br, Cl тощо) описаним значенням є значення, одержане для найменшої маси ізотопу. Усі результати одержували з експериментальними похибками, які зазвичай пов'язані із застосуванням способом.

- Далі в даному документі "SQD" означає одиничний квадрупольний детектор, "MSD" означає мас-селективний детектор, "RT" означає кімнатну температуру, "BEH" означає містковий гібрид етилсилоксану/діоксиду кремнію, "DAD" означає детектор на діодній матриці, "HSS" означає діоксид кремнію підвищеної міцності.

Таблиця 4а

Коди способів LCMS (швидкість потоку виражена в мл/хв.; температура колонки (Т) в °C; час аналізу у хвиликах)

Код способу	Прилад	Колонка	Рухома фаза	Гradient	Швидкість потоку ----- Т колонки	Час аналізу (хв.)
Спосіб А	Waters: Acquity® UPLC® DAD/SQD	Waters: BEH C18 (1,7 мкм, 2,1*50 мм)	A: 10 мМ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> в 95 % H <sub>2</sub> O+5 % CH <sub>3</sub> CN B: CH <sub>3</sub> CN	Від 95 % А до 5 % А за 1,3 хв., утримування протягом 0,7 хв.	0,8 мл/хв. ----- 55 °C	2

Таблиця 4б

Дані аналізу LCMS – R<sub>t</sub> означає час утримування (у хвиликах), [M+H]<sup>+</sup> означає масу протонованої сполуки, спосіб стосується способу, застосовуваного для аналізу (LC)MS

№ спол.	R <sub>t</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	Спосіб
1	0,76	401,2	399,2	Спосіб А

#### Ядерний магнітний резонанс (ЯМР)

Спектр <sup>1</sup>H ЯМР реєстрували на спектрометрі Bruker DPX-400 зі стандартними послідовностями імпульсів, що працює за 400 МГц. Хімічні зсуви (δ) реєстрували у частинах на мільйон.

Спол. № 1: <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>, 120 °C) δ ppm 0,81 (d, J=6,6 Гц, 3 H), 1,43 (qd, J=12,4, 4,4 Гц, 1 H), 1,89 (br dq, J=13,4, 3,1 Гц, 1 H), 2,44 (s, 6 H), 2,49-2,53 (m, 1 H), 3,11 (t, J=12,7 Гц, 1 H), 3,35 (dd, J=12,9, 11,1 Гц, 1 H), 3,57 (td, J=10,8, 4,1 Гц, 1 H), 4,00-4,27 (m, 2 H), 6,98 (t, J=54,2 Гц, 1 H), 7,00 (s, 2 H), 7,53 (s, 1 H), 8,68 (s, 1 H).

#### Фармакологічні приклади

Сполука, передбачена в даному винаході, являє собою інгібітор PDE2, зокрема PDE2A. Результати тестування сполуки 1 у декількох фармакологічних аналізах показані нижче.

#### Аналіз PDE2A in vitro

Людську рекомбінантну PDE2A (hPDE2A) експресували у клітинах Sf9 із застосуванням рекомбінантної конструкції rPDE10A на основі бакуловірусу. Клітини збирали через 48 год. після інфікування та білок hPDE2A очищали за допомогою метал-хелатної хроматографії на Ni-сефарозі 6FF. Сполуки, які тестуються, розчиняли та розбавляли у 100 % DMSO до 100-кратної концентрації порівняно з кінцевою концентрацією в аналізі. Розведення сполуки (0,4 мкл) додавали у 384-луночні планшети до 20 мкл буфера для інкубації (50 мМ Tris, pH 7,8, 8,3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,7 мМ EGTA). У буфер для інкубації додавали 10 мкл ферменту hPDE2A та реакцію починали шляхом додавання 10 мкл субстрату до кінцевої концентрації, що становить 10 мкМ cGMP та 0,01 мкМі <sup>3</sup>H-cGMP. Реакційну суміш інкубували протягом 45 хвилин за кімнатної температури. Після інкубації реакцію зупиняли за допомогою 20 мкл стоп-реагенту, який складається із гранул із PDE для SPA (сцинтиляційного аналізу зближення) за концентрації 17,8 мг/мл, доповнених 200 мМ ZnCl<sub>2</sub>. Після осаджування гранул протягом 30 хвилин вимірювали радіоактивність за допомогою сцинтиляційного лічильника Perkin Elmer Topcount, та результати виражали в імп./хв. Для одержання значень для холостої проби фермент не включали у

реакційну суміш, а заміняли буфером для інкубації. Контрольні значення одержували шляхом додавання DMSO у кінцевій концентрації 1 % замість сполуки. Криву найкращого зближення викреслювали по точках за допомогою способу найменшої суми квадратів на графіку залежності % контрольного значення із віднятим значенням для холостої проби від концентрації сполуки, та на підставі цієї кривої одержували значення концентрації напівмаксимального інгібування ( $IC_{50}$ ).

#### Аналіз PDE3A in vitro

Людську рекомбінантну PDE3A (hPDE3A) придбавали у вигляді частково очищеного лізату клітин комах від Scottish Biomedical, її клонували із головного мозку людини й експресували у клітинах Sf9. Сполуки, які тестуються, розчиняли та розбавляли у 100 % DMSO до 100-кратної концентрації порівняно з кінцевою концентрацією в аналізі. Розведення сполуки (0,4 мкл) додавали у 384-луночні планшети до 20 мкл буфера для інкубації (50 mM Tris, pH 7,8, 8,3 mM  $MgCl_2$ , 1,7 mM EGTA). У буфер для інкубації додавали 10 мкл hPDE3A та реакцію починали шляхом додавання 10 мкл субстрату до кінцевої концентрації, що становить 0,4 мкМ cAMP та 2,4 мкКі/мл [ $^3H$ ]-cAMP. Реакційну суміш інкубували протягом 60 хв. за кімнатної температури. Після інкубації реакцію зупиняли за допомогою 20 мкл стоп-реагенту, який складається із гранул із PDE для SPA (сцинтиляційного аналізу зближення) за концентрації 17,8 мг/мл, доповнених 200 mM  $ZnCl_2$ . Після осаджування гранул протягом 30 хв. вимірювали радіоактивність за допомогою сцинтиляційного лічильника Perkin Elmer Topcount, та результати виражали в імп./хв. Для одержання значень для холостої проби фермент не включали у реакційну суміш, а заміняли буфером для інкубації. Контрольні значення одержували шляхом додавання DMSO у кінцевій концентрації 1 % замість сполуки. Криву найкращого зближення викреслювали по точках за допомогою способу найменшої суми квадратів на графіку залежності % контрольного значення із віднятим значенням для холостої проби від концентрації сполуки, та на підставі цієї кривої одержували значення концентрації напівмаксимального інгібування ( $IC_{50}$ ).

#### Аналіз PDE10A in vitro

Пацюкову рекомбінантну PDE10A (rPDE10A2) експресували у клітинах Sf9 із застосуванням рекомбінантної конструкції rPDE10A на основі бакуловірусу. Клітини збирали через 48 год. після інфікування та білок rPDE10A очищали за допомогою метал-хелатної хроматографії на Ni-сефарозі 6FF. Сполуки, які тестуються, розчиняли та розбавляли у 100 % DMSO до 100-кратної концентрації порівняно з кінцевою концентрацією в аналізі. Розведення сполуки (0,4 мкл) додавали у 384-луночні планшети до 20 мкл буфера для інкубації (50 mM Tris, pH 7,8, 8,3 mM  $MgCl_2$ , 1,7 mM EGTA). У буфер для інкубації додавали 10 мкл ферменту rPDE10A та реакцію починали шляхом додавання 10 мкл субстрату до кінцевої концентрації, що становить 60 нМ cAMP та 0,008 мкКі  $^3H$ -cAMP. Реакційну суміш інкубували протягом 60 хвилин за кімнатної температури. Після інкубації реакцію зупиняли за допомогою 20 мкл стоп-реагенту, який складається із гранул із PDE для SPA (сцинтиляційного аналізу зближення) за концентрації 17,8 мг/мл. Після осаджування гранул протягом 30 хвилин вимірювали радіоактивність за допомогою сцинтиляційного лічильника Perkin Elmer Topcount, та результати виражали в імп./хв. Для одержання значень для холостої проби фермент не включали у реакційну суміш, а заміняли буфером для інкубації. Контрольні значення одержували шляхом додавання DMSO у кінцевій концентрації 1 % замість сполуки. Криву найкращого зближення викреслювали по точках за допомогою способу найменшої суми квадратів на графіку залежності % контрольного значення із віднятим значенням для холостої проби від концентрації сполуки, та на підставі цієї кривої одержували значення концентрації напівмаксимального інгібування ( $IC_{50}$ ).

Таблиця 5а

Сполука	$IC_{50}$ PDE2A (нМ)
1	0,95
1. 2HCl	0,7

Таблиця 5b

$pIC_{50}$  відповідає  $-\log IC_{50}$ , вираженому у моль/л

Сполука	$pIC_{50}$ (PDE2A)	$pIC_{50}$ PDE3B	$pIC_{50}$ PDE10A2
1	9,07	5,21	7,06
1.2HCl	9,11	5,15	6,93

Виявлення фосфорування GLUR1 за допомогою вестерн-блотінгу

PDE2 в основному експресується в гіпокампі, корі головного мозку та смугастому тілі та здатний гідролізувати cAMP та cGMP. Міграцію AMPA-R можна регулювати за допомогою активації PKA (за допомогою cAMP) або cGKII (за допомогою cGMP). Було показано, що фосфорилювання субодиниці Glu1 в AMPA-R має особливо важливе значення для виявлення LTD (зниження) та LTP (підвищення) та збереження спогадів.

Способи

Сполуку 1 (розчинену в 10 % CD+1 HCl) вводили р.о. (перорально) пацюкам Спраг-Дуулі (180-200 г; 10 і 40 мг/кг) і через 2 години тварин умертвляли шляхом декапітації. Гіпокамп препарували і тканину піддавали швидкому заморожуванню та зберігали за -80 °C.

Після розморожування здійснювали лізис тканини у реагенті для екстракції тканини, доповненому 5 мМ EDTA та сумішшю інгібіторів протеаз і фосфатаз. Зразки, що містять білок, денатурували за допомогою буфера для зразка LDS та відновлювального засобу (Life Technologies, Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія, США), та вкриті завантажували 50 мкг білку та піддавали електрофорезу із застосуванням 10 % поліакриламідного гелю із Bis-Tris (Bio-Rad, Геркулес, Каліфорнія, США) за 90-160 В. Потім білки з гелів переносили за допомогою електроблотінгу на нітроцелюлозну мембрану Trans blot turbo із розміром пор 0,2 мкм (Bio-Rad) із застосуванням системи для переносу Trans-blot Turbo (Bio-Rad). Мембрани блокували протягом 1 год. за RT у забуференому Tris сольовому розчині з Tween-20 (TBS-T: 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween-20), який містить 5 % знежирене сухе молоко (Santa Cruz Biotechnology, Даллас, Техас, США), та інкубували з первинним антитілом протягом ночі за 4 °C із забезпеченням легкого струшування (антитіло 31232 до загального Glu1 від Abcam, антитіло 76321 до Ser845 pGlu1 від Abcam, обидва в розведенні 1/1000). Блоти промивали п'ять разів буфером TBS-T та інкубували зі вторинним антитілом протягом 1 год. за RT (вторинне антитіло віслюка до антитіла кролика, кон'юговане з HRP, розведення 1/1000). Імунофарбування виявляли після промивання буфером TBST за допомогою субстрату SuperSignal із максимальною чутливістю для виявлення на фемторівні за допомогою вестерн-блотінгу (Thermo scientific, Крамлінгтон, Великобританія). Сигнали записували та кількісно оцінювали за допомогою хемілюмінісценції (G-box Syngene, Syngene, Крамлінгтон, Великобританія).

Результати цього тесту показані на фігурі 1.

Зайнятість PDE2 сполукою 1

Способи

Зайнятість PDE2A оцінювали за допомогою авторадіографії ex-vivo із застосуванням [<sup>3</sup>H]B-17a (описаний у WO2013/000924) як радіоліганду (сполука 12 у Buijnsters et al., (2014). Structure-Based Design of a Potent, Selective, and Brain Penetrating PDE2 Inhibitor with Demonstrated Target Engagement. ACS Med Chem Lett. 5(9):1049-53.) Самців пацюків Wistar (200-250 г) обробляли шляхом перорального введення середовища-носія або зростаючих доз [<sup>3</sup>H]B-17a та умертвляли через одну годину. Головний мозок відразу видаляли з черепа та піддавали швидкому заморожуванню в охолоджену сухим льодом 2-метилбутані (-40°C). Зрізи смугастого тіла товщиною двадцять мкм нарізали за допомогою кріостатного мікротома Leica CM 3050 (van Hopplynus, Бельгія), розміщували у розмороженому стані на предметні скельця (SuperFrost Plus Slides, LaboNord, Франція) та зберігали за -20 °C до застосування.

Після розморожування зрізи висушували у холодному потоці повітря та інкубували протягом однієї хвилини із 30 нМ [<sup>3</sup>H]B-17a в Tris-HCl (50 мМ, pH 7,4), що містить 0,3 % BSA. Зрізи головного мозку від оброблених лікарським засобом та оброблених середовищем-носієм тварин інкубували одночасно. Неспецифічне зв'язування виміряли на зрізах мозочку, ділянці головного мозку, яка не містить ферменту PDE2A. Після інкубації надлишок [<sup>3</sup>H]B-17a змивали крижаним буфером 2 рази по 10 хвилин із наступним швидким зануренням у дистильовану воду. Потім зрізи висушували у потоці холодного повітря.

Зрізи головного мозку поміщали у β-imager (Biospace, Париж) на 4 години та радіоактивність, що виходила від зрізаних ділянок головного мозку, кількісно оцінювали із застосуванням програми Beta vision (Biospace, Париж). Специфічне зв'язування визначали як різницю між загальним зв'язуванням у смугастому тілі та неспецифічним зв'язуванням у мозочку. Відсоток зайнятості рецептора лікарським засобом, який вводили тварині, відповідав 100 % мінус відсоток міченого рецептора у обробленій тварині. Для визначення значень ED<sub>50</sub> значення відсотка зайнятості рецептора наносили на графік у залежності від дози та рівняння найбільш відповідної сигмоїдальної логарифмічної кривої доза-ефект розраховували за допомогою нелінійного регресивного аналізу із застосуванням програми Prism от GraphPad. Значення ED<sub>50</sub> (доза лікарського засобу, яка забезпечує 50 % зайнятість рецептора) за довірчих

інтервалів із надійністю 95 % розраховували на підставі кривих доза-відповідь.

Результати цього тесту показані на фігурі 2.

Ефект сполуки 1 щодо синаптичної передачі

Важливі реагенти

Сахарозний буфер для препарування, що містить (у мМ) сахарозу (150), NaCl (40), KCl (4),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,3),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (7),  $\text{NaHCO}_3$  (26),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,5), D-глюкозу (10), урівноважений газовою сумішшю 95 %  $\text{O}_2$  та 5 %  $\text{CO}_2$ . Штучна цереброспінальна рідина (ACSF), яку застосовували під час урівноваження та реєстрації, містила (у мМ): NaCl (124), KCl (2,7),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,25),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,3),  $\text{NaHCO}_3$  (26),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2), D-глюкозу (10), аскорбінову кислоту (2), урівноважені газовою сумішшю 95 %  $\text{O}_2$  та 5 %  $\text{CO}_2$ . ACSF одержували із CNQX та кінуреновою кислотою в концентрації 50 мкМ та 1 мМ відповідно. Сполуку 1 одержували безпосередньо перед застосуванням із основного розчину (з DMSO) в ACSF та з кінцевою концентрацією DMSO, що не перевищувала 0,1 %. Усі реагенти були від Sigma-Aldrich, якщо не вказано інше.

Тварини (вид, вага та стать)

Використовуваними тваринами були самці пацюків Спраг-Довлі з вагою у діапазоні 145-200 г, придбані у Charles River, Німеччина.

Одержання зрізів гіпокампа

Горизонтальні зрізи головного мозку (300 мкм) одержували із середньої-вентральної частини гіпокампа самців пацюків Спраг-Довлі, яких анестезували ізофлураном згідно зі стандартним протоколом. Зрізи нарізали за допомогою вібраційного мікротому для тканин (Leica VT1200S) у холодному (4 °C) сахарозному буфері для препарування зі швидкістю 0,1 мм/с. Після нарізання зрізи залишали для урівноваження за 35 °C протягом 20 хв., а потім забезпечували відновлення за RT протягом щонайменше однієї години у штучній цереброспінальній рідині (ACSF). Із одного головного мозку одержували від трьох до чотирьох зрізів.

Система тестування

Усі дані реєстрували за допомогою установки MEA, комерційно доступної від MultiChannel Systems MCS GmbH (Ройтлінген, Німеччина), що складається із 4-канального генератора імпульсів та 60-канального основного модуля з підсилювачем, приєднаного до 60-канальної плати A/D. Програмне забезпечення для стимуляції, реєстрації даних та аналізу являло собою комерційно доступне від Multi Channel Systems: MC Stim (II версія 2.0.0) та MC Rack (версія 3.8.1.0) відповідно. Усі експерименти проводили із застосуванням 3-мірної MEA (Ayuda Biosystems, S.A., CH-1015, Лозанна, Швейцарія), яка складалася із 60 електродів із загостреною формою та висотою 60 мкм, відстань між якими становила 100 мкм. Електроди MEA виготовлені із платини із опором у діапазоні 600 кОм - 900 кОм.

План експерименту

Ефект сполуки 1 щодо синаптичної передачі досліджували шляхом реєстрації позаклітинних польових потенціалів у зрізах гіпокампа. Добре відомо, що синаптична передача може забезпечувати відхилення позаклітинного польового потенціалу, що відображає синхронну синаптичну активність у популяції нейронів, які оточують реєструвальний електрод.

Реєстрація даних позаклітинного польового потенціалу. Після відновлення зрізи головного мозку поміщали на чип MEA під мікроскопом та розміщували 60 реєструвальних електродів у ділянці синапса моховитих волокон (зубчата звивина - CA3) гіпокампа. Розчини ACSF безперервно перфузували зі швидкістю потоку 2 мл/хв. Температуру в камері MEA підтримували на рівні  $32 \pm 0,1$  °C, при цьому елемент Пельтьє був розташований на основному модулі з підсилювачем MEA. Усі дані реєстрували за допомогою установки MEA, комерційно доступної від MultiChannel Systems MCS GmbH (Ройтлінген, Німеччина). Два сусідніх електроди в чипі вибирали для стимуляції моховитих волокон у ділянці хілуса зубчатої звивини та fEPSP реєстрували у термінальній зоні ділянки CA3 гіпокампа. Польові позаклітинні постсинаптичні потенціали (fEPSP) викликали шляхом стимуляції входу моховитих волокон за допомогою двох послідовних електричних імпульсів з інтервалом 30 мс та повторювали кожні 60 с (тривалість імпульсу становила 100 мкс, та сила стимулювального струму (мкА) становила 40 % щодо максимальної амплітуди). Контрольні експерименти проводили одночасно зі зрізами, які довільним чином відносили до оброблюваних за допомогою середовища-носія (DMSO). N позначає число зрізів, та, як правило, 3-4 зрізи використовували із розрахунку на кожну тварину. Викликані відповіді на рівні пост-синаптичних нейронів (fEPSP) реєстрували, якщо вони задовольняли визначені критерії якості, у тому числі: правильне розташування, стабільний фон (відхилення у межах  $\pm 10$  % протягом десяти послідовних хвилин, амплітуда  $> 100$  мкВ). Дані fEPSP від обраних електродів збирали за 5 кГц та записували на жорсткий диск ПК для

здійснення аналізу в режимі оффлайн. Одночасно значення амплітуди fEPSP від обраних електродів збирали у режимі реального часу (за допомогою програми MC Rack) для контролю та відстеження якості експерименту. Дані наносили на графік у файлі електронної таблиці для здійснення аналізу в режимі оффлайн.

5 Слабку довготривалу потенціацію (LTP) викликали за допомогою однократного височастотного імпульсу (HFS) із забезпеченням меншої, ніж максимальна потенціація fEPSP.

Результати цього тесту показані на фігурах 3 та 4, що стосується ефекту сполуки 1 щодо базальної синаптичної передачі, та на фігурі 5, що стосується ефекту сполуки 1 щодо сприяння індукції LTP за допомогою протоколу слабкої довготривалої потенціації. Цікаво відмітити, що аналогічні результати одержували з іншими інгібіторами PDE2, як, наприклад, 4-(1-азетидиніл)-7-метил-5-[1-метил-5-[5-(трифторметил)-2-піридиніл]-1H-піразол-4-іл]-імідазо[5,1-f][1,2,4]триазином [CAS 1394033-54-5] (WO2012114222, Pfizer) (див. фігуру 6).

Дослідження PK/PD однократної дози PDE2i на собаках

15 У цих дослідженнях використовували самиць та самців собак породи Marshall Beagle (1-6 років): 2 самці та 2 самиці з розрахунку на кожну групу обробки. Цереброспінальну рідину (CSF) відбирали за допомогою канюлі з направляючою голкою з бокового шлуночка головного мозку тварин, що знаходилися у свідомості, підключених до апарату.

Зразки CSF та крові на початковому рівні відбирали за 2-5 днів перед введенням дози. Тваринам не давали їжі протягом ночі та на наступний ранок вводили дозу натщесерце (перорально за допомогою зонда). У попередньо визначені періоди часу після введення дози збирали кров і/або CSF для вимірювання рівнів сполуки та cGMP. Аналіз cGMP виконували за допомогою LC-MS/MS: 25 мкл CSF розбавляли за допомогою 125 мкл штучної CSF (STIL (20 нг/мл)), центрифугували та вводили в колонку 25 мкл. Застосовувані системи являли собою: систему для UPLC Shimadzu SIL-30 (колонка Hypercarb (50 мм x 1 мм (3 мкм)), градієнт: водний розчин основи (10 mM карбонату амонію)-ацетонітрил (від 5 % до 98 % за 5,5 хвилини) за швидкості потоку 250 мкл/хв.) та систему API Sciex 5500, обладнану джерелом ESI (селективний MRM перехід (маса/заряд 346,1→152,1 (час витримки 75 мс)). Результати цього дослідження узагальнені на фігурі 7. Після введення однократної дози сполуки 1 відзначали наступні результати спостережень: напад тремору від легкого до помірного ступеня тяжкості у 3/8 тварин за дози 0,5 мг/кг; седативний ефект і/або напади тремору в 6 із 7 тварин за дози 1 мг/кг (одній тварині не вводили дозу через обмежену кількість сполуки). Плазматична фармакокінетика характеризувалась незалежною від дози лінійністю. Спостерігали дозозалежне підвищення рівня cGMP у CSF. Обмежені дані індивідумів у групі середовища-носія PDE2 H-2 (n=2 у моменти часу 1, 4 та 8 год.) були зумовлені похибками в аналізі.

35 Підвищена за допомогою інгібування PDE2 синаптична пластичність у анестезованих пацієнтів: експериментальний ситуаційний дослід зі сполукою 1

Введення

Синаптична пластичність є основоположним механізмом багатьох нейробіологічних функцій. Довготривала потенціація (LTP), форма тривалого строго локалізованого збільшення сили синаптичного зв'язку в гіпокампі, а також корі головного мозку, являє собою синаптичну основу пам'яті та навчання (Cooke and Bliss, Curr Opin Investig Drugs. 2005;6(1): 25-34). Збільшення та зменшення сили синаптичного зв'язку залежить від активності пресинаптичних та постсинаптичних нейронів, від того, як нейронні сітки головного мозку функціонують під час створення чуттєвого уявлення великої кількості об'єктів у пам'яті та одержання відповідної рухової відповіді. Різні ознаки цих синаптичних змін, в інтактному головному мозку, є критично важливими у функціонуванні різних типів нейронних сіток і функціонуванні декількох різних систем нейронних ланцюгів головного мозку. Таким чином, очікується, що LTP буде послабленою у випадку вікових психічних та нейродегенеративних розладів, як, наприклад, хвороба Альцгеймера (Bergado and Almaguer, Neural Plast. 2002;9(4):217-32; Rowan et al., Biochem Soc Trans. 2005;33: 563-7). Процедура, яка проводиться на тісно пов'язаних ділянках інтактного головного мозку тварин, що знаходяться під анестезією, є ефективним способом вивчення стійких змін щодо ефективної щільності та пластичності у ланцюгу гіпокамп-кора головного мозку після тетанічної електричної стимуляції із низькою та високою частотою, що доставляється одиничним або подвійним імпульсом (Albensi et al., Exp Neurol. 2007; 204:1-13).

55 Досліди допомагають розширити розуміння нейронних ланцюгів, які лежать в основі розвитку порушення сили синаптичного зв'язку, тобто визначити прямий шлях у ланцюзі та роль конкретної біологічної мішені, охопленої конкретними ділянками, в опосередкуванні послаблення синаптичного зв'язку. Процедура дозволяє тестувати фармакологічні засоби, метою яких є відновлення патологічних форм нейропластичності, наприклад, обертання розвитку дефектів LTP і щільності нейронних сіток шляхом підвищення ефективності

синаптичної передачі, що, як очікується, має сприятливі ефекти щодо пов'язаних когнітивних і навчальних здібностей (Cooke and Bliss, 2005; Albensi et al., 2007).

Фосфодіестерази (PDE) являють собою клас ферментів, які відповідають за метаболічну інактивацію вторинних месенджерів, циклічного 3',5'-аденозинмонофосфату (сAMP) та циклічного 3',5'-гуанозинмонофосфату (сGMP) (Francis et al. *Physiol Rev.* 2011, 9: 651-90). Класифікували 11 родин PDE включно на основі їхньої структури, ферментативної активності та розповсюдження (Omori and Kotera *Circ Res.* 2007; 100:309-27). Роль PDE у підсиленні передачі сигналу за допомогою циклічних нуклеотидів робить ці ферменти привабливими мішенями для регуляції збуджуваності та підвищення ефектів взаємодії нейронів. У головному мозку PDE2 в основному експресується в корі головного мозку, гіпокампі та смугастому тілі, де він контролює гідроліз сAMP. За останні декілька років дослідницькі групи зосередились на розробці інгібіторів PDE2, націлених на зміну активності внутрішньоклітинних вторинних месенджерів, сGMP та сAMP, із впливом на пластичність та когнітивні процеси (Duinen et al., *Curr Pharm Des.* 2015; 21:3813-28; Gomez and Breitenbucher, *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23: 6522-7; Xu et al., *Neurobiol Aging.* 2015; 36:955-70; Barco et al., *Expert Opin Ther Targets* 2003; 7: 101-114).

У даному досліді вивчали те, чи приводить інгібування PDE2 за допомогою сполуки 1 до змін у збуджуваності або у здатності виявлення синаптичної потенціалії у зубчатій звивині анестезованих дорослих особин Спраг-Доулі.

Матеріали та способи

Тварини

Дані експерименти проводили у суворій відповідності до інструкцій Міжнародної асоціації з атестації та акредитування утримання лабораторних тварин (AAALAC) та директиви Ради Європейських Співтовариств (86/609/EEC) від 24-го листопада 1986 р., та їх затверджував локальний етичний комітет. Пацюків Спраг-Доулі (з вагою 170-200 г на момент проведення хірургічного втручання) утримували групою у клітках із вентиляцією зі встановленим 12-годинним циклом світла/темряви (увімкнення світла в 07:00 ранку) після їхньої доставки у віварії та утримували в контрольованих умовах навоколишнього середовища.

Хірургічне втручання та електрофізіологія

Пацюків анестезували за допомогою внутрішньочеревної ін'єкції уретану в дозі 1,5 г/кг ваги тіла. Тваринам надягали стереотаксичну раму для вживлення електродів, і температуру їхнього тіла постійно контролювали за допомогою ректального зонда та підтримували на рівні 37 °C за допомогою електричної грілки. Додаткове введення уретану (0,2–0,5 г/кг) проводили у разі необхідності забезпечення повної анестезії. Два невеликих отвори (діаметром 1 мм) просвердлювали у черепі в місці розташування структур лівого гіпокампа для стимулювального та реєструвального електродів. Двополярний стимулювальний електрод; пара скручених дротів із нержавіючої сталі із нанесеним поліімідним покриттям, наконечники яких знаходяться у горизонтальній площині на відстані 0,125 мкм один від одного (MS303/13-B. *PlasticsOne*), розміщували у ділянки медіального перфорантного шляху (mPP) (AP-7,5, ML-3,8, DV-2,5), а реєструвальний електрод із нанесеним нержавіючим покриттям (MS303T-2-AIU, 0,008-0,005) розміщували у ділянки зубчатої звивини (DG) дорсального відділу гіпокампа (AP-2,8, ML-3,8, DV-3,8). Тверду оболонку головного мозку проколювали через обидва отвори та стимулювальний і реєструвальний електроди опускали дуже повільно (0,2 мм/хв.) через кору головного мозку та верхні шари гіпокампа в mPP та DG дорсального відділу гіпокампа. Під час хірургічного втручання докладали всіх зусиль, щоб мінімізувати страждання тварини.

Нахил польового збуджувального постсинаптичного потенціалу (fEPSP) використовували як міру збуджувальної синаптичної передачі. Одиначні монофазні прямокутні імпульси тривалістю 0,1 або 0,2 мс, які генеруються блоком живлення постійного струму (МС, Німеччина), застосовували, наприклад, щодо mPP і викликані відповіді виникали у DG. Сигнали внутрішньоклітинного польового потенціалу підсилювали; фільтрували за допомогою фільтру зі смугою пропускання від 1 Гц до 2 кГц, перетворювали на цифрову форму та здійснювали аналіз за допомогою замовленого програмного забезпечення. Електроди опускали доти, доки не спостерігали негативне відхилення fEPSP із максимальною відповіддю. Для забезпечення стабілізації збуджуваності перед вимірами надавалось не менше 30 хв. Потім подавали монофазні імпульси постійного струму за значень інтенсивності стимуляції в діапазоні від 50 до 500 мкА для одержання кривих вводу/виводу (I/O) та визначення максимального PSA та нахилів fEPSP, і потім інтенсивність стимуляції, яка забезпечувала 50 % від максимальної відповіді (тобто контрольний імпульс), застосовували у наступних експериментах.

Індукція LTP. Потім застосовували контрольну стимуляцію кожні 5 хв. перед і після тетанічної стимуляції. Відповіді викликали за допомогою високочастотної стимуляції (серія із 10 стимулів по 20 прямокутних імпульсів тривалістю 0,2 мс за 200 Гц, інтервал між стимулами 5 мс,



інтервал між серіями 2 секунди). П'ять викликаних відповідей усереднювали для кожного моменту часу виміру під час експериментів: через пів години після реєстрації вихідного рівня, безпосередньо перед застосуванням лікарського засобу або тетанічної стимуляції (контроль індукції LTP). Величину синаптичної потенціації виражали у вигляді відсотка збільшення амплітуди популяційного спайка DG (PSA), а також нахилу fEPSP за інтервал часу після тетанічної стимуляції порівняно з нахилами, усередненими за весь фіксований 30-хвилинний період дії фармакологічного засобу.

Відповіді за вибраної інтенсивності імпульсу збирали та усереднювали до моменту часу не більше 130 хв. після тетанізації. Амплітуду популяційного спайка визначали як середнє значення між амплітудою від першого позитивного піка (а) до першого негативного піка (b) та амплітудою від негативного піку (b) до другого позитивного піку (c):  $[(a - b)/(c - b)]/2$ . Для кількісної оцінки нахилу fEPSP лише дуже ранні компоненти хвилі ( $\Delta V/\Delta t$ ) вимірювали для уникнення перешкод від популяційного спайка.

#### Гістологія

Наприкінці електрофізіологічного дослідження проводили електричну стимуляцію із силою струму 500 мкА протягом 20 с із одержанням осередку враження у зоні наконечників стимульованого та реєструвального електродів і мізки збирали для гістологічного підтвердження правильності розміщення електродів. Зрізи головного мозку (20 мм) вивчали за допомогою світлового мікроскопу. Тварин із неправильним розміщенням електродів виключали із дослідження.

#### Лікарський засіб

Сполуку 1 розчиняли в 10 % циклодекстрині (CD) + 1 HCl+NaCl для підшкірного (SC) введення.

#### Статистичний аналіз

Для кожної тварини стабільні відповіді на початковому рівні (до тетанусу) протягом 30 хв. усереднювали та середнє значення нормалізували, приймаючи за 100 %, і дані відповіді після тетанусу виражали щодо середнього значення на початковому рівні. Порівняння ефектів середовища-носія та сполуки 1 після тетанусу проводили за 30-хвилинні інтервали із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу повторних вимірів (ANOVA) по рангах із наступними апостеріорними порівняннями за методом Данета щодо початкового рівня (значення 100 %). Відмінності між обробками у певні моменти часу перевіряли за допомогою двостороннього критерію Стюдента. Усі процедури статистичного аналізу проводили із застосуванням програмного забезпечення StatExact.

#### Результати

Сполука 1 не впливала на базальну синаптичну передачу, оскільки значущих змін порівняно з контролем, обробленим середовищем-носієм, протягом початкового рівня до тетанусу не виявляли (фіг. 8b). У межах парадигми індукції LTP підшкірне введення сполуки 1 (40 мг/кг) підвищувало стійку (>2 год.) синаптичну потенціацію (фіг. 8b). Через 0-30 хв. після завершення тетанізації нахили PSA становили  $164 \pm 13$  % порівняно з рівнем середовища-носія, що становить  $124 \pm 5$  %,  $p < 0,05$ ). Через 90-120 хв. після тетанізації амплітуда PSA була все ще вищою ( $179 \pm 20$  % порівняно з рівнем середовища-носія, що становить  $116 \pm 17$  %,  $p < 0,05$ ). Аналогічно, аналіз кривих стимул-відповідь виявив значуще стійке збільшення нахилу fEPSP порівняно з умовою з середовищем-носієм (90-120 хв:  $137 \pm 24$  % порівняно з рівнем середовища-носія, що становить  $94 \pm 7$  %,  $p < 0,05$ ) (фіг. 8c).

Загалом, сполука 1 забезпечувала LTP in vivo, але не впливала на базальну синаптичну передачу.

#### Приклади можливих композицій

Як використовується у всіх даних прикладах, "активний інгредієнт" стосується сполуки 1, її фармацевтично прийнятної солі або сольвату.

Типовими прикладами рецептур для складу за даним винаходом є наведені нижче.

#### 1. Таблетки

Сполука 1 5-50 мг

Фосфат дикальцію 20 мг

Лактоза 30 мг

Тальк 10 мг

Стеарат магнію 5 мг

Картопляний крохмаль до 200 мг

#### 2. Суспензія

Водну суспензію для перорального введення одержують таким чином, що кожен 1 мілілітр містить 1-5 мг однієї зі сполуки 1, 50 мг натрій-карбоксиметилцелюлози, 1 мг бензоату натрію, 500 мг сорбіту і води, доданої до об'єму 1 мл.

## 3. Форма для ін'єкцій

Композицію для парентерального введення одержують шляхом змішування 1,5 % за вагою сполуки 1 за даним винаходом у 10 % за об'ємом пропіленгліколю у воді.

## 4. Мазь

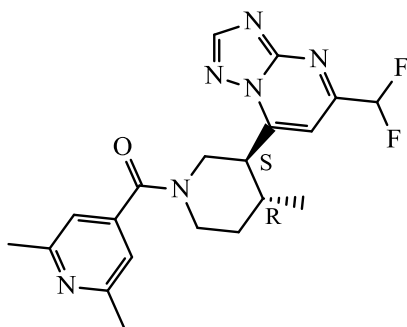
- 5 Сполука 1 5-1000 мг  
 Стеариловий спирт 3 г  
 Ланолін 5 г  
 Білий вазелін 15 г  
 Вода до 100 г

- 10 Припустимі варіанти не слід розглядати як відхилення від обсягу даного винаходу. Буде очевидно, що фахівці в даній галузі можуть змінювати описаний таким чином винахід різними способами.

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

15

1. Сполука, що характеризується формулою (1):



, (1)

або її фармацевтично прийнятна сіль або сольват.

2. Хлористоводнева сіль сполуки формули (1) за п. 1.

- 20 3. Фармацевтична композиція, що містить терапевтично ефективну кількість сполуки за п. 1 або п. 2 та фармацевтично прийнятний носій.

4. Сполука за п. 1 або п. 2 або фармацевтична композиція за п. 3 для застосування як лікарського препарату.

- 25 5. Сполука за п. 1 або п. 2 або фармацевтична композиція за п. 3 для застосування в лікуванні або попередженні розладу центральної нервової системи, вибраного із групи психотичних розладів і станів; тривожних розладів; рухових розладів; наркотичної залежності; афективних розладів; нейродегенеративних розладів; розладів або станів, які включають як симптом синдром дефіциту уваги та/або порушення пізнавальної діяльності; розладів, пов'язаних із запам'ятовуванням і консолідацією пам'яті; інсульту й аутичного розладу.

- 30 6. Сполука або фармацевтична композиція для застосування за п. 5, де психотичні розлади вибрані із групи шизофренії; шизофреноформного розладу; шизоафективного розладу; маніакального розладу; психотичного розладу, викликаного вживанням певних речовин; розладів особистості параноїдального типу та розладу особистості шизоїдного типу;

- 35 тривожні розлади вибрані із групи панічного розладу; агарофобії; специфічної фобії; соціальної фобії; obsесивно-компульсивного розладу; посттравматичного стресового розладу; гострого стресового розладу та генералізованого тривожного розладу;

- рухові розлади вибрані із групи хвороби Хантінгтона та дискінезії; хвороби Паркінсона; синдрому неспокійних ніг та есенційного тремору; синдрому Туретта й інших тикових розладів; розлади, пов'язані зі вживанням певних речовин, вибрані із групи зловживання алкоголем; алкогольної залежності; алкогольного абстинентного синдрому; алкогольного абстинентного синдрому з делірієм, психотичного розладу, викликаного вживанням алкоголю; амфетамінової залежності; амфетамінового абстинентного синдрому; кокаїнової залежності; кокаїнового абстинентного синдрому; нікотинової залежності; нікотинного абстинентного синдрому; опіоїдної залежності та опіоїдного абстинентного синдрому;

- 45 афективні розлади вибрані з депресії; манії; біполярного розладу I типу, біполярного розладу II типу; циклотимічного розладу; дистимічного розладу; значного депресивного розладу; терапевтично резистентної депресії та афективного розладу, викликаного вживанням певних речовин;

- нейродегенеративні розлади вибрані із групи хвороби Паркінсона; хвороби Хантінгтона; деменції; хвороби Альцгеймера; мультиінфарктної деменції; СНІД-асоційованої деменції або лобно-скроневої деменції;
- розлади або стани, що включають як симптом синдром дефіциту уваги та/або порушення
- 5 пізнавальної діяльності, вибрані із групи деменції, асоційованої із хворобою Альцгеймера; мультиінфарктної деменції; деменції, зумовленої хворобою із тільцями Леві; алкогольної деменції або стійкої деменції, викликані вживанням певних речовин; деменції, асоційованої із внутрішньочерепними пухлинами або черепно-мозковою травмою; деменції, асоційованої із
- 10 хворобою Хантінгтона; деменції, асоційованої із хворобою Паркінсона; СНІД-асоційованої деменції; деменції внаслідок хвороби Піка; деменції, зумовленої хворобою Крейцфельда-Якоба; делірію; амнестичного розладу; посттравматичного стресового розладу; інсульту; прогресуючого над'ядерного паралічу; олігофренії; порушення здатності до навчання; синдрому дефіциту уваги та гіперактивності (ADHD); помірного когнітивного порушення; синдрому Аспергера; вікового когнітивного порушення та когнітивного порушення, пов'язаного зі
- 15 сприйняттям, увагою, навчанням або пам'яттю;
- розлади, пов'язані із запам'ятовуванням і консолідацією пам'яті, вибрані з розладів пам'яті.
7. Спосіб одержання фармацевтичної композиції за п. 3, який **відрізняється** тим, що фармацевтично прийнятний носій ретельно змішують із терапевтично ефективною кількістю сполуки за п. 1 або п. 2.
- 20 8. Сполука за п. 1 або п. 2 у комбінації з додатковим фармацевтичним засобом для застосування в лікуванні або попередженні стану, наведеного в будь-якому із пп. 5-6.
9. Продукт, що містить
- (а) сполуку за п. 1 або п. 2 та
- (b) додатковий фармацевтичний засіб,
- 25 у вигляді комбінованого препарату для одночасного, роздільного або послідовного застосування в лікуванні або попередженні стану, наведеного в будь-якому із пп. 5-6.
10. Спосіб лікування розладу, вибраного із групи психотичних розладів і станів; тривожних розладів; рухових розладів; наркотичної залежності; афективних розладів; нейродегенеративних розладів; розладів або станів, які включають як симптом синдром
- 30 дефіциту уваги та/або порушення пізнавальної діяльності; розладів, пов'язаних із запам'ятовуванням і консолідацією пам'яті; інсульту й аутичного розладу; що передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективною кількістю сполуки за п. 1 або п. 2 або терапевтичної кількості фармацевтичної композиції за п. 3.

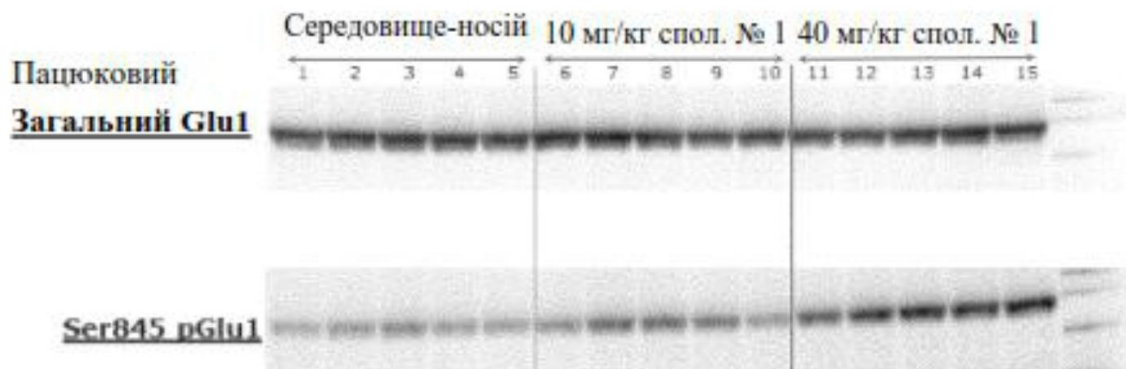
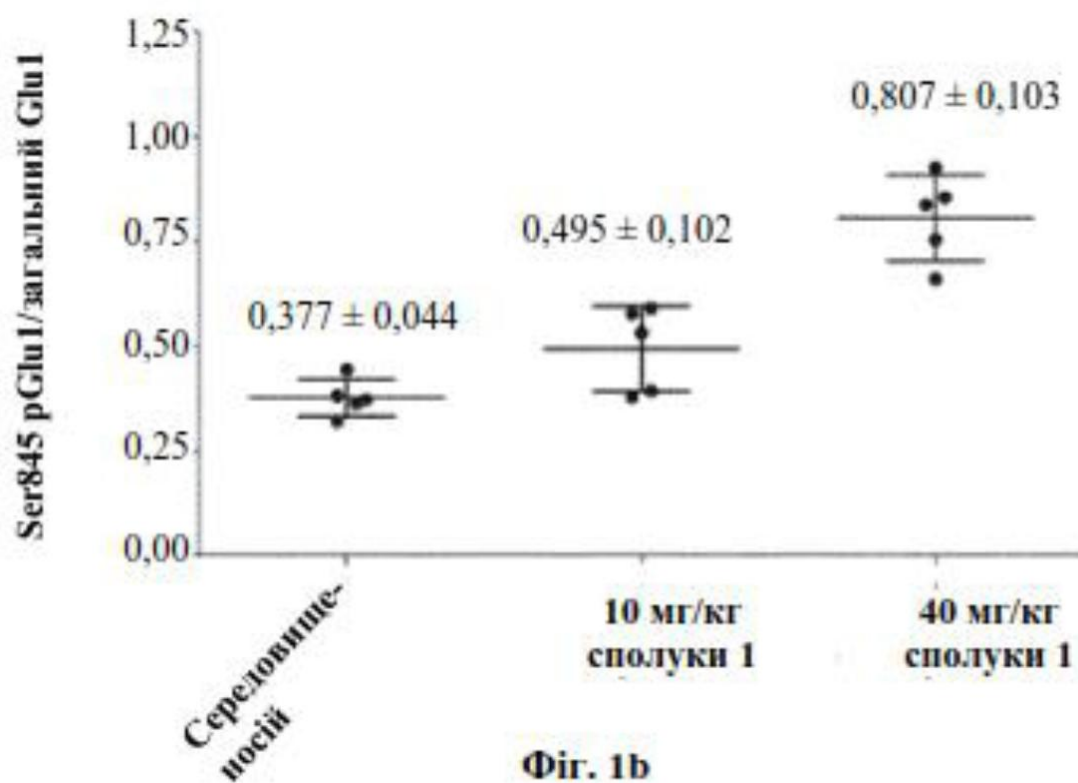
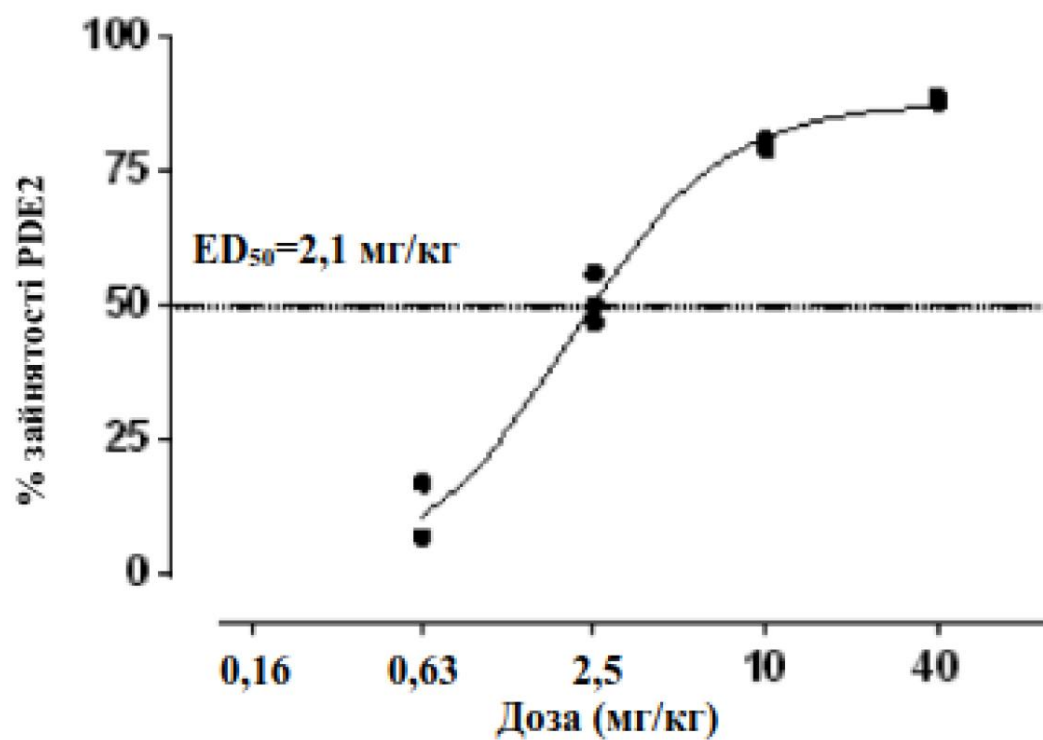


Fig. 1a



Сполука 1 (1 год., po)



Фіг. 2

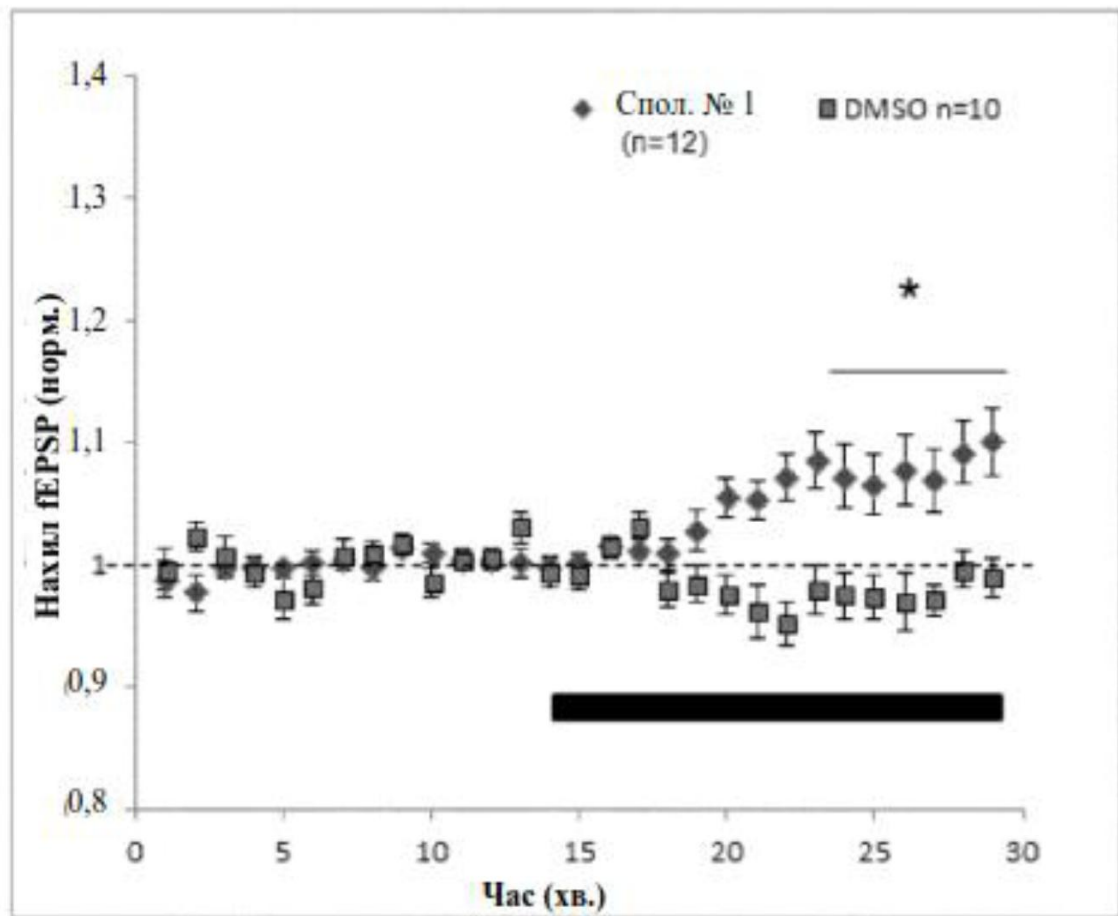


Fig. 3

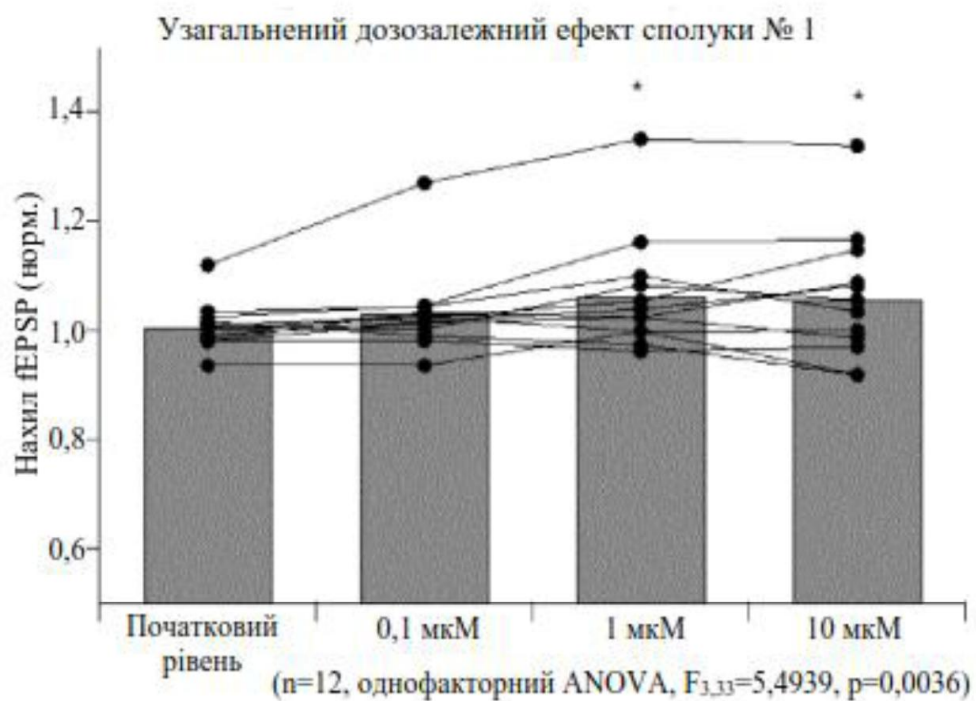
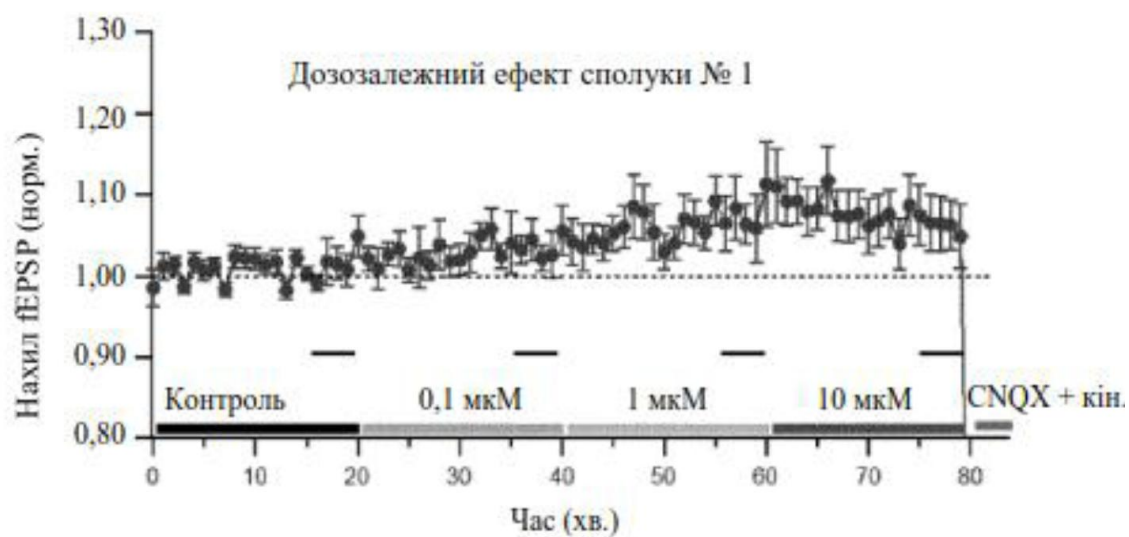


Fig. 4

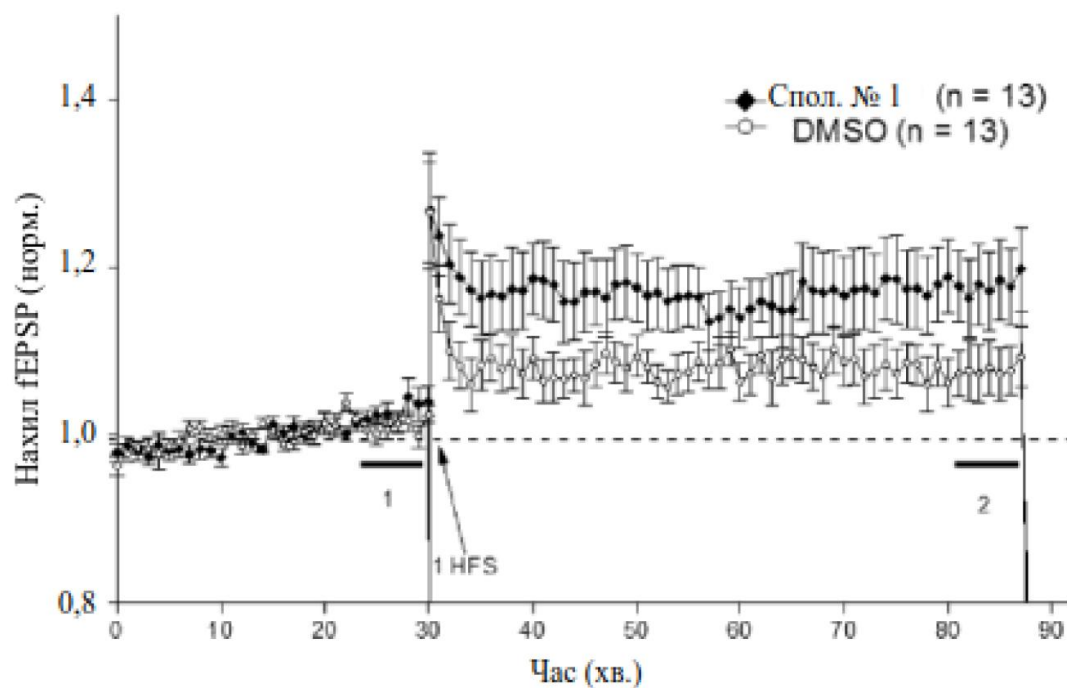
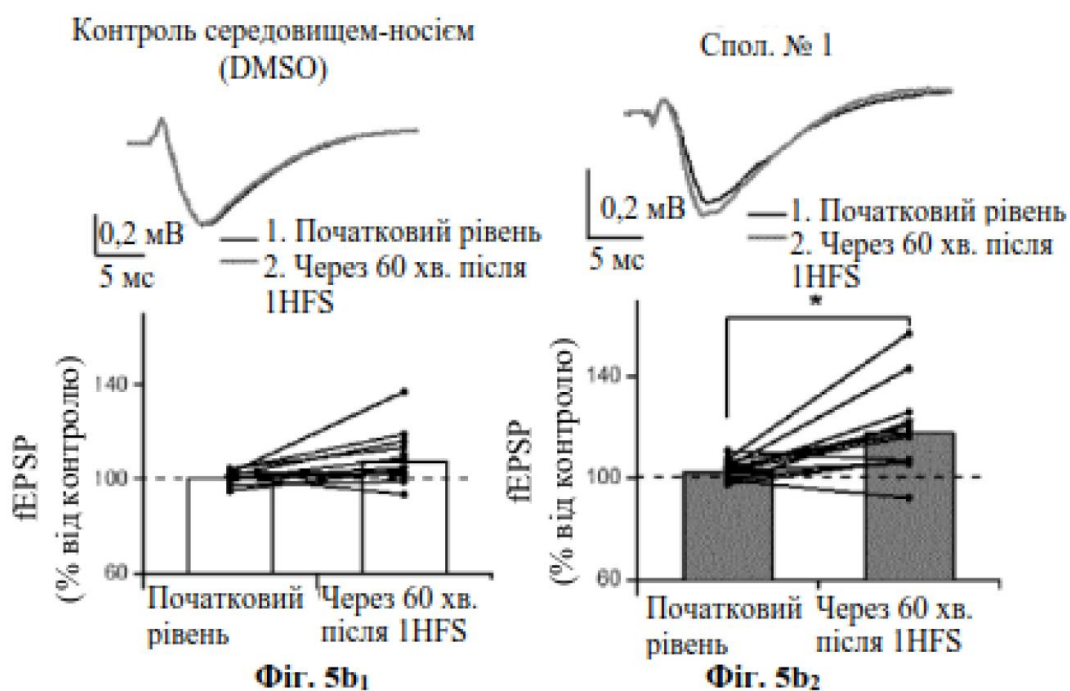


Fig. 5a



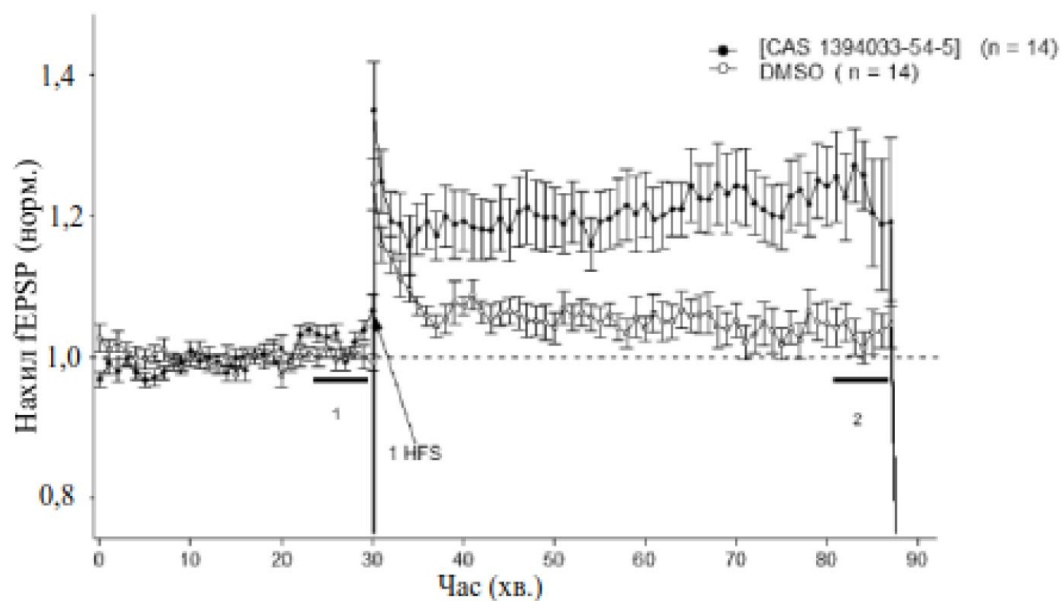


Fig. 6a

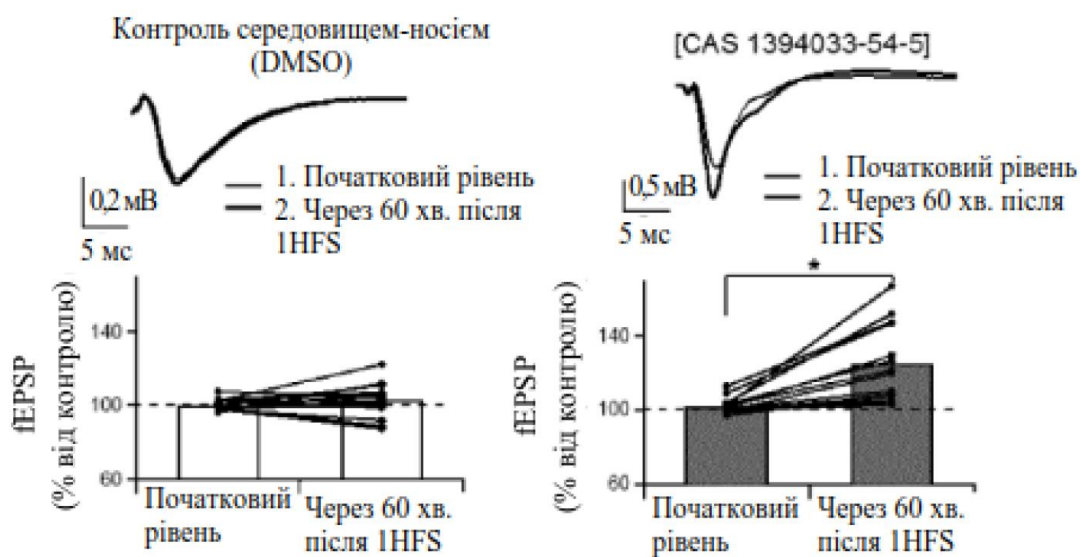
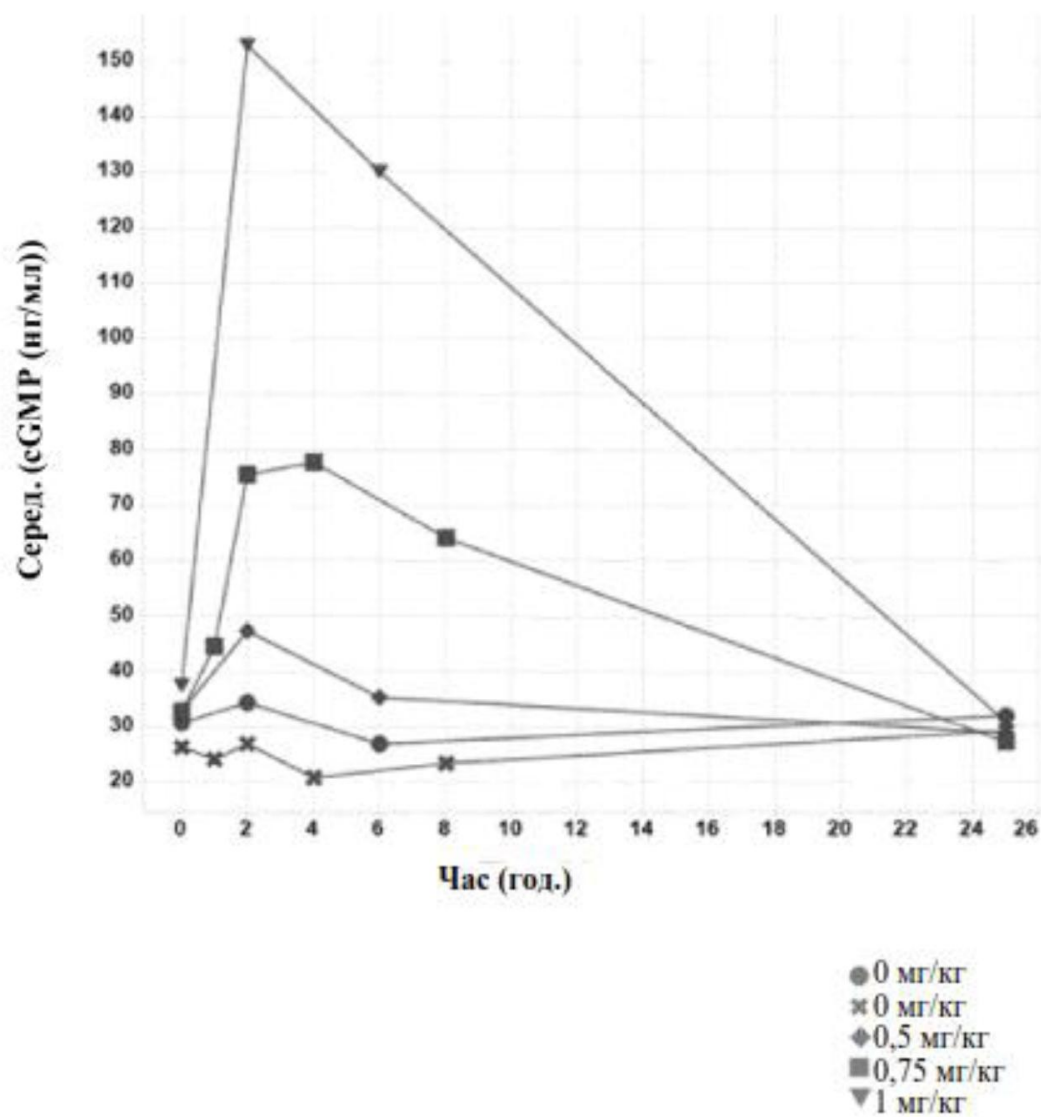


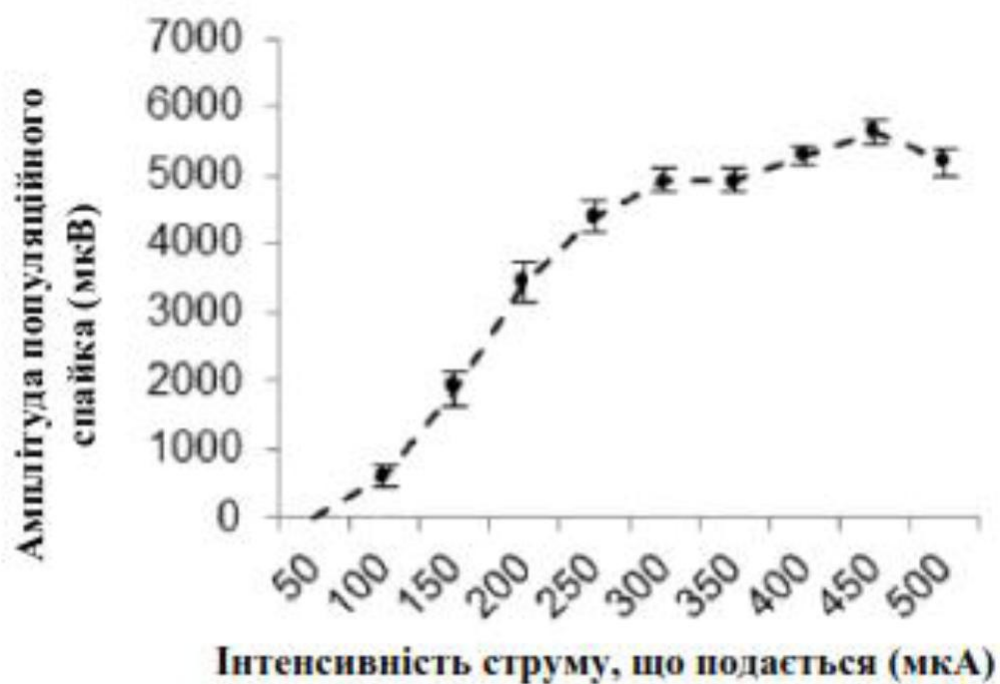
Fig. 6b<sub>1</sub>

Fig. 6b<sub>2</sub>

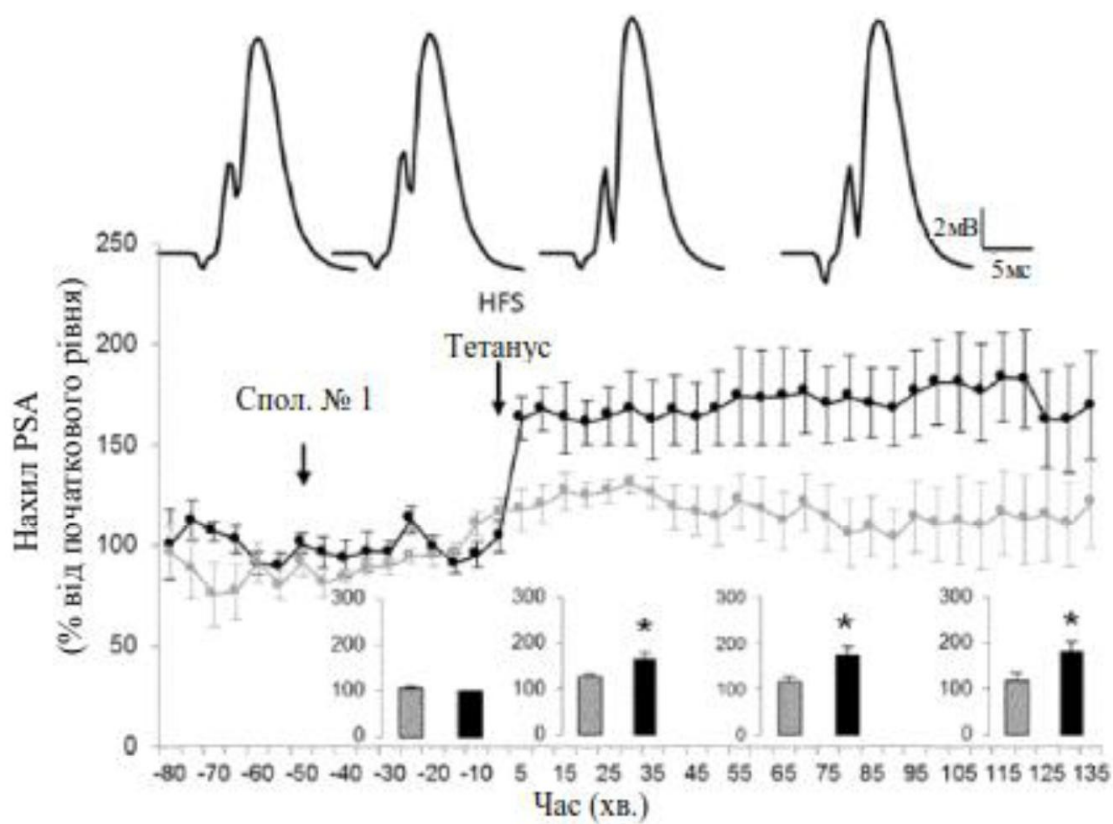




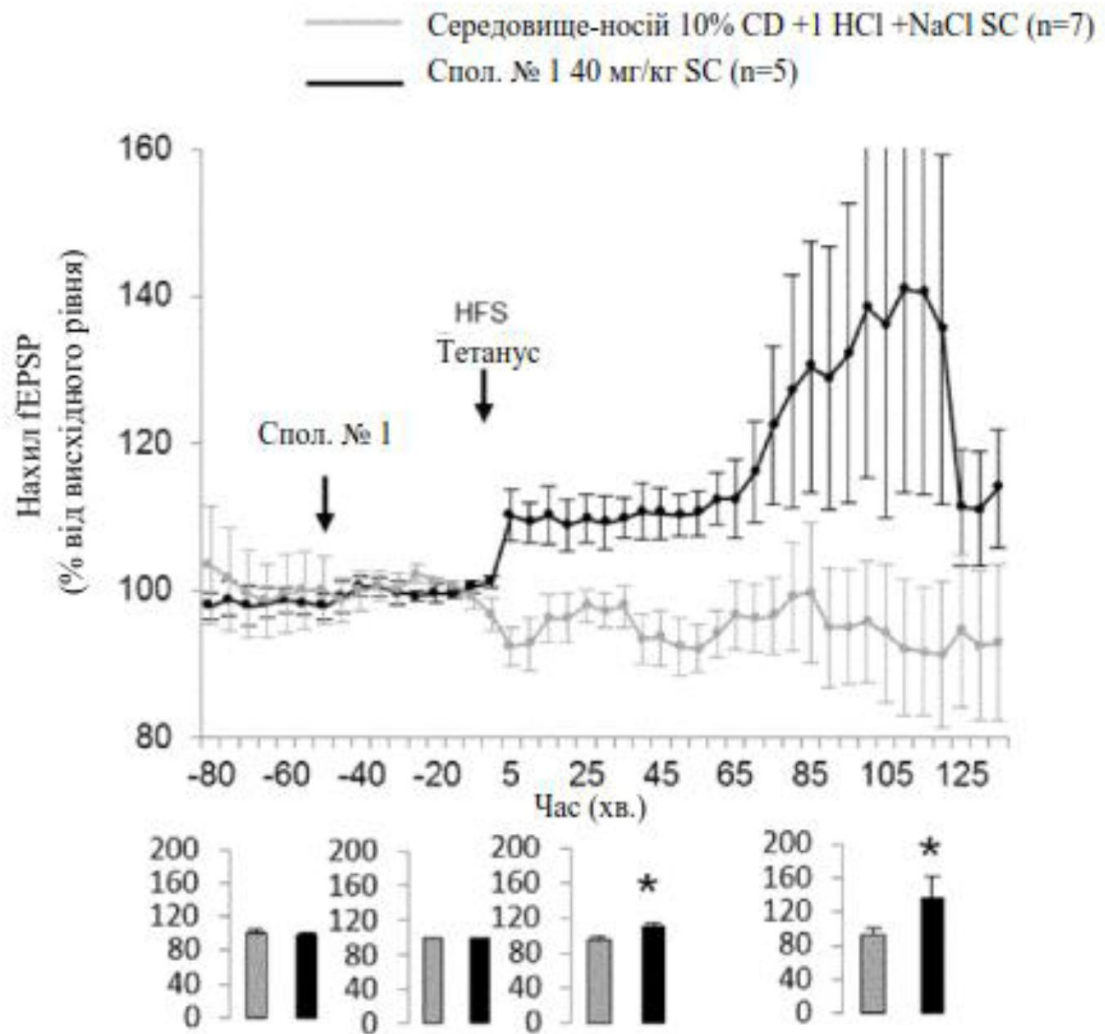
Фіг. 7



Фіг. 8a



Фіг. 8b



Фиг. 8с